

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Aclaramiento renal de las fracciones glucuronizadas de la  
bilirrubina en las diversas icterias**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Indalecio Candel Monserrate**

DIRECTOR:

**Manuel Díaz Rubio**

**Madrid, 2015**

FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

TA 1117

BIBLIOTECA UCM



5309162554

Tesis Doctoral

" ACLARAMIENTO RENAL DE LAS FRACCIONES GLUCURONIZADAS DE LA BILIRRUBINA EN LAS DIVERSAS ICTERICIAS "

Autor

Indalecio Candel Monserrate

Director de la Tesis

Prof. Dr. D. M. Díaz Rubio

Tribunal Calificador

Presidente: Prof. Díaz Rubio

Vocales: Prof. Fernandez Cruz

Prof. Poch Viñals

Prof. Duran Sacristan

Vocal secretario: Prof. Velasco Martín



Esta Tesis fue leída en Madrid, el 17 de Diciembre de 1973, siendo calificada de Sobresaliente " cum laude " .



Biblioteca  
de Medicina

## DEDICATORIA

A mi padre, flor segada al abrir, cuyo ideal, siempre en mí presente, me impulsa por la vida.

A mi madre, ejemplo permanente de abnegación y cariño.

A mi esposa, infatigable y amorosa compañera.

A mis hijos, Francisco Javier y Juan Manuel, razón de mi ser y mi existir.

## A G R A D E C I M I E N T O

Es esencialmente imposible realizar un trabajo, salvar sus obstáculos, sin que en todo momento no necesitemos de la ayuda de alguien. De aquí la obligación de la gratitud. Por ésto que, respondiendo a mi cualidad humana, sienta y desee expresar mi agradecimiento a todos aquéllos que, en mayor o menor grado, hayan contribuido a la elaboración de nuestro trabajo.

Quiero, en primer lugar, dedicar mi más profunda gratitud al Prof-Dr. Díaz Rubio, director de esta tesis, hombre y maestro, quien, con su ciencia y cariño, ha sabido concebir e impulsar las ideas, a la par que infundir en nosotros la inquietud en la búsqueda de la verdad, el aliento para no desmayar en el camino.

Al Dr. Díaz-Rubio (Jr.), profesor y compañero a la vez, nuestro más directo colaborador en la realización de este trabajo, quiero también expresarle mi sincero agradecimiento por su continua ayuda y consejo, sin los que difícilmente hubiésemos podido llevar a cabo el mismo.

A los enfermos, razón esencial de nuestro quehacer cotidiano, por su sacrificada contribución a nuestro esfuerzo. Ellos constituyen indudablemente el estímulo diario de nuestra perseverancia en el trabajo, por lo que no podemos omitir en estas líneas unas palabras de reconocido agradecimiento.

A los compañeros del Laboratorio Central del Hospital Clínico de San Carlos, por su colaboración en la determinación de diversos parámetros bioquímicos; a los compañeros de la Cátedra III de Patología Médica, por su continua ayuda en la selección de enfermos; al Departamento Central de Informática Médica (Dr. Martín Cinto), y a todos los que



de una forma directa o indirecta han contribuido a la realización del trabajo, nuestro sincero agradecimiento.

No quiero cerrar estas líneas sin expresar mi más sentida gratitud a mi hermano Enrique Candel, por su inestimable, cariñosa y desinteresada ayuda en la obtención de buena parte de la bibliografía y escritura a máquina del texto

Lo bueno que hayamos podido conseguir con nuestro modesto trabajo, sea labor de todos; lo malo, solo obra mía.

I N D I C E

## I N D I C E

	<u>Pag.</u>
ABREVIATURAS .....	6
INTRODUCCION .....	7
METABOLISMO DE LA BILIRRUBINA: .....	8
a) Origen de la bilirrubina .....	9
b) Circulación de la bilirrubina en el plasma .....	21
c) Captación de la bilirrubina por el hígado .....	31
d) Transporte intrahepatocitario de la bilirrubina no conjugada .....	38
e) Conjugación de la bilirrubina .....	39
f) Transporte intrahepatocitario de la bilirrubina conjugada .....	54
g) Excreción hepática de la bilirrubina .....	55
h) Destino de la bilirrubina en el intestino .....	64
i) Excreción renal de la bilirrubina .....	72
MOTIVO DE NUESTRO TRABAJO. PROBLEMAS QUE SE PLANTEAN .....	89
MATERIAL. METODOS. CALCULOS ESTADISTICOS:	
A) Material .....	92
B) Método .....	93
C) Cálculos estadísticos .....	98
RESULTADOS: .....	107
1) Grupo N. Normales .....	108
2) Grupo A. Ictericias hemolíticas .....	117
3) Grupo B. Subgrupo "a" Ictericias por hepatopatías agudas .....	132
4) Grupo B. Subgrupo "b" Ictericias por hepatopatías crónicas .....	148

5) Grupo B. Subgrupo "c" Ictericias por hepatopatías	
tumorales .....	162
6) Grupo C. Ictericias obstructivas .....	179
DISCUSION DE LOS RESULTADOS .....	197
SINTESIS Y CONCLUSIONES .....	220
BIBLIOGRAFIA .....	227

## ABREVIATURAS

---

A B R E V I A T U R A S

Alb.	Albúmina de la orina.
ALBU.	Albúmina de la sangre.
B.T.	Bilirrubina total.
B.D.	Bilirrubina directa.
B.I.	Bilirrubina indirecta.
B.T.-S.	Bilirrubina total en sangre.
B.T.-O.	Bilirrubina total en orina.
B.D.-S.	Bilirrubina directa en sangre.
B.D.-O.	Bilirrubina directa en orina.
B.I.-S.	Bilirrubina indirecta en sangre.
B.I.-O.	Bilirrubina indirecta en orina.
B.S.P.	Retención de la bromo en sangre.
C <sub>m</sub>	Aclaramiento de bilirrubina monoglucuronizada.
C <sub>D</sub>	Aclaramiento de bilirrubina diglucuronizada.
C <sub>C</sub>	Aclaramiento de creatinina.
Dens.	Densidad de orina.
Di.	Bilirrubina diglucuronizada.
DI.-S.	Bilirrubina diglucuronizada en sangre.
DI.-O.	Bilirrubina diglucuronizada en orina.
F. Alc.	Fosfatasa alcalina.
G-glo.	Gamma-globulina.
GOT.	Transaminasa glutámico-oxalacética.
GPT.	Transaminasa glutámico-pirúvica.
LAP.	Leucino-amino-peptidasa.
Mono.	Bilirrubina monoglucuronizada.
MO-S.	Bilirrubina monoglucuronizada en sangre.
MO-O.	Bilirrubina monoglucuronizada en orina.
pH-S.	pH en sangre.
pH-O.	pH en orina.
Prot.	Protrombina.
Vol/m.	Volumen minuto de orina.

## INTRODUCTION

---

## I N T R O D U C C I O N

Antes de abordar de lleno el tema objeto de nuestro trabajo, es decir, la eliminación renal de los pigmentos biliares, consideramos útil e imprescindible un conocimiento previo del origen, naturaleza, propiedades, etc. de la bilirrubina, que nos ayudará a una mejor comprensión de sus mecanismos y formas de eliminación del organismo. Dedicaremos especial atención a aquéllos puntos más directamente relacionados con la eliminación renal, planteando su problemática en éste sentido e intentando resolver algunos de los interrogantes surgidos en torno a ella, motivo fundamental de nuestra tesis y cuya discusión y conclusiones serán expuestos al final.

Por tanto, creemos oportuno comenzar por la revisión actualizada de todo el metabolismo de la bilirrubina, desde su origen hasta su transformación y eliminación del organismo por una u otra vía.



**M E T A B O L I S M O   D E   L A   B I L I R R U B I N A**

---

## M E T A B O L I S M O D E L A B I L I R R U B I N A

---

La bilirrubina es un producto orgánico, de estructura tetrapirrólica lineal, derivado del catabolismo del Hem o de otras estructuras precursoras afines. No se le conoce ninguna función fisiológica; antes, al contrario, en ciertas circunstancias fisiológica, posee carácter tóxico para ciertos tejidos, siendo perjudicial al organismo (kernicterus); su destino, por tanto, es su excreción fuera del mismo, proceso que requiere complicados mecanismos realizados fundamentalmente por el hígado.

Vamos a estudiar el metabolismo de la misma, desde su origen más remoto a su excreción. El interés de dicho estudio radica, no solo en el entendimiento de muchas circunstancias patológicas con que se presenta en la clínica, sino también en la mejor comprensión de los mecanismos y factores que intervienen en su eliminación. Indirectamente, su conocimiento ayuda a interpretar mejor el metabolismo de otras sustancias, similares en estructura química o en camino metabólico, de más alto significado biológico que la bilirrubina (corticoides, estrógenos, tiroxina, adrenalina, morfina, salicilamida, etc., como ejemplo de conjugación similar a la de aquella; mioglobina, peroxidasas, citocromos a-b-c, catalasas, etc. como ejemplos de compuestos de similitud estructural, etc.). Como dice Arias en una maravillosa revisión de estos problemas (53): "la bilirrubina en el organismo (con la excepción del riesgo del kernicterus) no parece realizar ningún bien ni ningún mal; su presencia parece no tener otra misión que la de desafiar a los fisiólogos y la de confundir a los clínicos".

## ORIGEN DE LA BILIRRUBINA.-

Para su mejor comprensión hemos de remontarnos al origen de las porfirinas, siguiendo el tratado de Bioquímica de Cantarow (37).

La síntesis de las porfirinas comienza con la condensación de succinil-Co A y glicina activada por el fosfato de piridoxal (fig. 1), resultando el ácido alfa-amino-beta-cetoadípico, el cual es descarboxilado a delta-aminolevulínico. Dos moléculas de éste se condensan y dan lugar al porfobilinógeno, el monopirrol original de las porfirinas. No se sabe el mecanismo por el cual se unen cuatro moléculas de porfobilinógeno para formar un tetrapirrol cíclico, ni tampoco si tiene lugar la formación intermedia de dipirroles o tetrapirroles lineales, aunque ésto es muy probable. De cualquier manera, en presencia de una porfobilinogenodesaminasa se condensan cuatro moléculas de porfobilinógeno, con pérdida de cuatro moléculas de amoníaco, para formar el uroporfirinógeno I (serie menor). Si a la par actúa una isomerasa, la ciclación da lugar al uroporfirinógeno III (serie mayor o principal). En ambos casos los primeros tetrapirroles cíclicos formados son del tipo uro (cadenas laterales tetracética, tetrapropiónica). Las uroporfirinas resultan de la oxidación de los uroporfirinógenos.

La descarboxilación de las cuatro cadenas laterales de ácido acético de los uroporfirinógenos a grupos metílicos, da lugar a coproporfirinógenos (tetrametílicos, tetrapropiónicos) que pasan a coproporfirinas al oxidarse. La coproporfirina I se excreta sin ser utilizada. Parte de la coproporfirina III se excreta, pero la mayor parte se convierte en protoporfirina, al transformarse dos de sus grupos propiónicos en grupos vinílicos (tetrametílica, dipropiónica, divinílica), a través de otros intermediarios cuyo proceso no es bien conocido.

Así formada la protoporfirina IX, la introducción de un átomo de hierro en la posición central, da lugar a la formación de Hem.

Finalmente, la unión del Hem a una proteína específica, da lugar a las hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina, citocromos a-b-c, catalasas,



peroxidasas, etc. En el caso de la hemoglobina, la proteína específica es una globina del grupo de las histonas. Una molécula de globina copula a cuatro moléculas de Hem.

Los procesos descritos hasta la formación de la protoporfirina IX tienen lugar en el hígado. Los restantes, hasta la formación de la hemoglobina, tienen lugar en la médula ósea, de tal forma que la síntesis de hemoglobina y la maduración de los eritrocitos se efectúan simultáneamente, lo cual requiere la presencia de algunos cofactores: ácido fólico, vit B<sub>12</sub> y cobre. El eritrocito primitivo posee porfirinas libres y no hemoglobina; al madurar la célula disminuye la concentración de porfirinas y aumenta la de hemoglobina. Esto juega un papel importante en el metabolismo de la bilirrubina: génesis del llamado "shunt/hiperbilirrubinémico", cuando la eritropoyesis es ineficaz (talasemia, anemia perniciosa), patología de la síntesis de las porfirinas en ciertos errores metabólicos (porfiria congénita, etc.), para la aparición del referido shunt hiperbilirrubinémico (33,62,66,93,97,99,107).

Una vez sintetizadas las hemoproteínas (fig. 2) veamos qué ocurre con su catabolismo (fig. 3). Con excepción de la hemoglobina, hay pocos datos acerca de la degradación de otras hemoproteínas. Se ha sugerido que la mioglobina es catabolizada a pigmentos biliares y se tienen datos directos para la catalasa en este sentido. Se desconoce por completo la vía catabólica de los citocromos.

Seguiremos, por tanto, la vía principal y mejor conocida, a la par que la única que ahora nos interesa, la de la hemoglobina.

LA DEGRADACION DE LA HEMOGLOBINA.- (8 gramos aproximadamente) comienza con la disgregación de los eritrocitos al terminar su periodo de vida (unos 120 días aproximadamente). Esto tiene lugar en las células del Sistema Reticulo-Endotelial (S.R.E.) principalmente en las del bazo, médula ósea e hígado, aunque puede ocurrir en cualquier tejido, como lo demuestra la gama de colores aparecidos en el lugar de la sangre extravasada: hematomas (27,116).

La muerte de los eritrocitos (33) es debida a factores dependientes

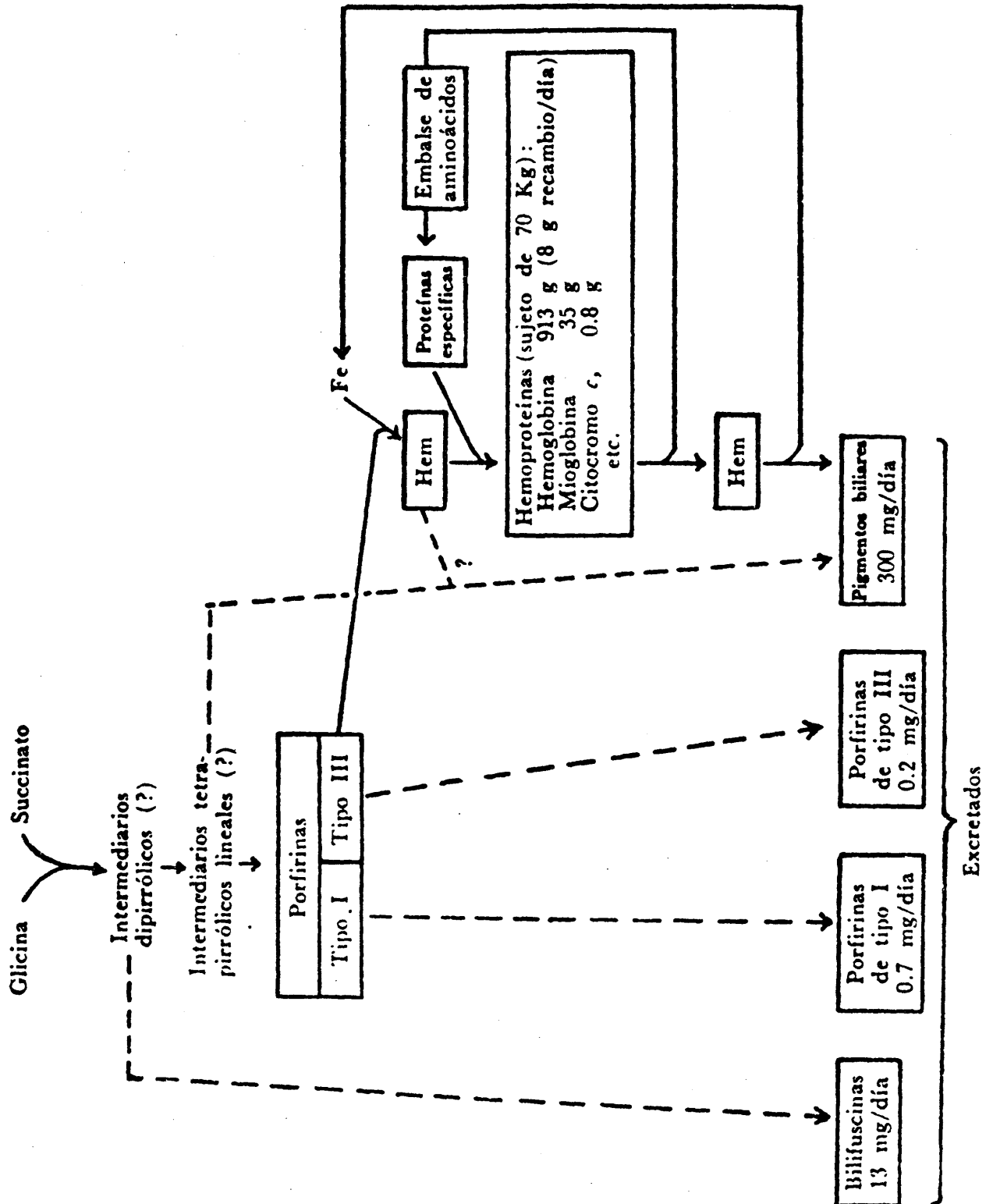


FIG. 2 SINTESIS DE LAS HEMOPROTEINAS (Cantarow)

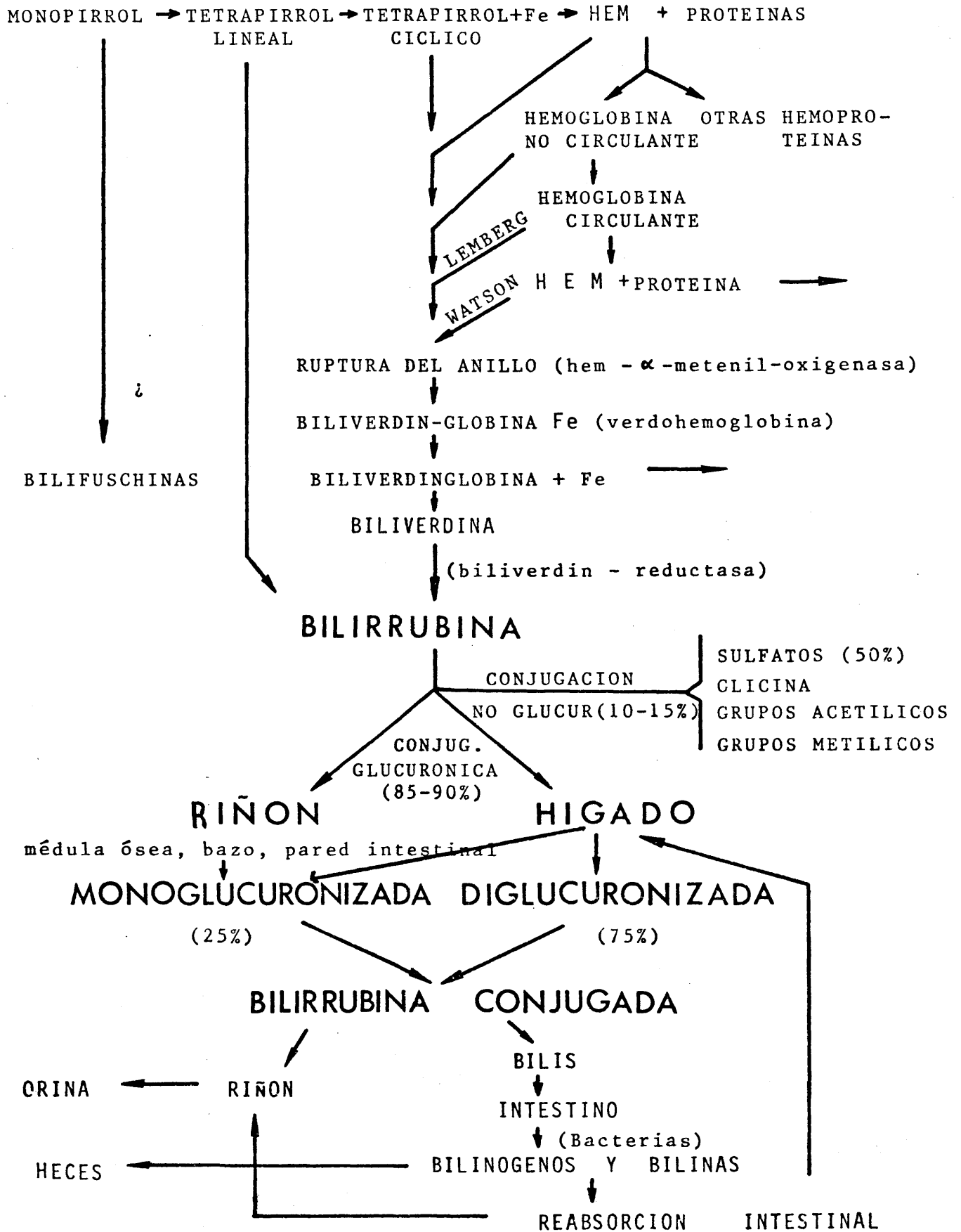


FIG. 3  
DEGRADACION DE LAS HEMOPROTEINAS

de la edad. Los determinantes de la senescencia de los glóbulos rojos se estudian mejor al comparar las diferencias en la composición y comportamiento funcional de eritrocitos jóvenes y viejos, lo que exige la separación de ambos tipos. Esto se consigue, sobre todo, por la alta ultracentrifugación, ya que los más viejos tienen mayor densidad. También se pueden separar por medio de la fragilidad osmótica, ya que son más frágiles los más senescentes. La capacidad de aglutinación es otro procedimiento, por cuanto es más acusada en los más viejos. Con todas esas técnicas podremos observar diferencias físico-químicas: densidad, fragilidad, aglutinabilidad, área de superficie; contenido en lípidos, colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos; carga eléctrica; deformabilidad; contenidos en enzimas: hexoquinasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, fosfoglucoisomerasa, piruvatoquinasa, aldolasa, fosfofructoquinasa, catalasa, colinesterasa, etc. Quizá el dato más importante para la supervivencia del eritrocito sea su deformabilidad: la reducción de la superficie en relación al volumen, supone disminución de la deformabilidad, consiguientemente aumento de la fragilidad. Se ha demostrado la existencia de glóbulos rojos de corta supervivencia en sujetos normales (69), sin conseguir la senescencia natural. Así mismo al margen de errores hemoglobínicos congénitos, se han descrito eritrocitos anormales (33), de los cuales se conocen tres tipos fundamentales con corpúsculo de Heinz (presencia de inclusiones intracelulares de hemoglobina): a) Defectos en el metabolismo de glóbulos rojos asociados con hemólisis tipo oxidante. b) Anemia congénita con corpúsculo de Heinz, debida a inestabilidad de la hemoglobina. c) Talasemias (37).

De cualquier manera, sea por senescencia natural de los hematíes, o por supervivencia corta de los mismos en sujetos normales, por presencia de eritrocitos anormales con corpúsculos de Heinz, por aberraciones hemoglobínicas, etc. el eritrocito es destruido y la hemoglobina puesta en libertad, bien dentro de la propia médula ósea o en la sangre circulante.

La hemoglobina circula en el plasma unida a la hemoglobina (33),



una glicoproteína cuya única función es la de formar un complejo estable, soluble, con la hemoglobina. La haptoglobina es una molécula simétrica que une la hemoglobina en la proporción molar de 1:1. Esta unión no es covalente. Parece ser que la haptoglobina (Hp) une dímeros de la hemoglobina (Hb) más que tetrameros.

El complejo Hb-Hp es secuestrado por los órganos del S.R.E. en proporción directa al flujo sanguíneo de cada uno: hígado -médula ósea- bazo. En los desórdenes hemolíticos y en la eritropoyesis ineficaz, debido a un rápido "clearance" del complejo Hb-Hp, tiene lugar una gran pérdida de Hp por parte del plasma. Esta también está baja en recién nacidos y en hepatopatías. Hay ausencias genéticas de Hp, como en los negros africanos.

En comparación con el complejo Hb-Hp, la Hb libre circulante desaparece más rápidamente del plasma. La captación del Hb por el hígado, médula ósea y bazo, es posible que se deba a su unión con la Hp, la cual se forma "in situ". El hígado es el principal, sino el único, lugar de producción endógena de Hp, por lo cual la captación de Hb por el mismo es superior a la de los otros órganos.

El complejo Hb-Hp es difícil de ser aclarado del plasma por el riñón, pero en los estados hemolíticos, en que el plasma se deplecciona de Hp, la Hb libre puede atravesar el glomérulo y dar lugar a hemoglobinuria. Aunque la Hb es de peso similar a la albúmina, la permeabilidad de aquella es muy superior, ya que es capaz de descomponerse en dos dímeros de 32.000 peso molecular cada uno, que luego se reconstruye a tetramero. Una vez filtrada puede ser reabsorbida por las células del epitelio tubular proximal mediante un proceso de pinocitosis. La globina y el grupo hem son rápidamente catabolizados, pero el hierro se almacena por largo tiempo. Si la cantidad de Hb filtrada excede la capacidad de absorción del túbulo proximal, tendrá lugar la hemoglobinuria.

Una vez captada la hemoglobina por las células del sistema reticuloendotelial, tiene lugar el proceso de degradación de la misma. Esto puede acontecer de dos maneras: a) Separación de la globina (la cual será reu-

tilizable) del grupo Hem, con posterior ruptura del anillo, teoría mantenida por Watson. b) Primaria ruptura del anillo y subsiguiente separación de la globina, como opina Lemberg. Esta segunda hipótesis es la más aceptada.

La formación de bilirrubina a partir de la hematina (116) fue demostrada por London y Pass in vivo y por Kench in vitro, lo cual fue fuertemente dudado por Lemberg. Este propuso un modelo de sistema químico en el que tenía lugar un acoplamiento oxidativo de la hemoglobina con ascorbato y oxígeno molecular in vitro, dando lugar a precursores del pigmento biliar: coeglobina y verdohemocrano, de los que, en medio ácido, se obtuvieron pequeñas cantidades de biliverdina. De cualquier modo, este sistema no enzimático proporcionaba una mezcla de isómeros de la biliverdina, mientras que, en la degradación fisiológica de la hemoglobina y otras hemoproteínas, solo se forma el isómero alfa del pigmento biliar.

La hematina no puede ser detectada en condiciones fisiológicas en la sangre, pero sí puede demostrarse su presencia en el plasma, unida a la albúmina (metemalbúmina) en ciertas circunstancias patológicas: hemólisis, severa hepatopatía, ciertos envenenamientos, etc. La idea de que la hematina era un intermediario en la degradación fisiológica de la hemoglobina, como acabamos de decir, fue sugerida primeramente por London y Kench, y posteriormente soportada por Snyder Schmid. Ellos inyectaron hematina- $C^{14}$  a ratas con fístula biliar externa y encontraron que la hematina era convertida a bilirrubina en una proporción similar a la observada cuando se inyectaba hemoglobina. El hallazgo de que la hematoporfirina y protoporfirina no eran convertidas a bilirrubina sugirió que la presencia de un átomo central de hierro era indispensable para la ruptura del anillo porfirina.

Nakajima y col. pretendieron haber caracterizado y purificado parcialmente un sistema enzimático soluble capaz de catalizar la conversión del Hem a un verdohem precursor de la biliverdina. Este cami-

no degradativo propuesto era básicamente similar al sugerido primeramente por Lemberg. Este enzima, llamado hem-alfa-metenil-oxigenasa, actuaba solamente sobre piridina-hemocromógeno, complejo haptoglobina-hemoglobina y mioglobina, mientras que era inactivo sobre la hematina, oxihemoglobina y metemoglobina.

La conversión del grupo Hem a precursor de la biliverdina por la hem-alfa-metenil-oxigenasa fue casi cuantitativa y requirió NADPH, hierro ferroso y un activador endógeno termoestable. Sin embargo, su importancia en el catabolismo fisiológico de la hemoglobina fue puesto en duda, por varias observaciones: a) La hem-alfa-metenil-oxigenasa se encontró solamente en hígado y riñón, mientras que bazo y médula ósea, ambos tejidos presumiblemente imbricados en la degradación de la hemoglobina, estuvieron casi desprovistos de actividad en dicho enzima. b) La referida enzima tenía una especificidad de sustrato poco habitual. c) La enzima eliminó el carbono del puente alfa del hem como formaldehído y no como monóxido de carbono, como generalmente es admitido.

Wise y Drabkin describieron un sistema enzimático del órgano de la placenta del perro, requiriendo ATP, NADP, nicotinamida, ascorbato y oxígeno, que convertía la Hb o el Hem en biliverdina, de la cual un 88% era la forma IX-alfa-isómera; en la reacción se liberaba monóxido de carbono.

A pesar de todo lo expuesto, se desconoce ciertamente la conversión del Hem o de la Hb a biliverdina. En cualquier caso, la ruptura del anillo tiene lugar por oxidación del puente alfa-meteno, gracias a la acción de la enzima hem-alfa-oxigenasa, recientemente aislada. Posteriormente se libera el hierro, dando lugar a la biliverdín-globina (bilirrubin-globina) y enseguida se separa la fracción globina, dejando en libertad a la biliverdina, la que es reducida rápidamente, por acción de una enzima, la biliverdín-reductasa, a bilirrubina, la cual pasa a la sangre.

Lo hasta aquí descrito constituye la fuente principal de la bil'

rrubina, es decir, la de origen eritrocítico; pero en modo alguno es la fuente única. Por otro lado, experimentos dignos de crédito demuestran que no todo el Hem eritrocítico es convertido en bilirrubina. Ostrow, Jandl y Schmid (85) inyectaron a ratas, con fistula biliar externa, glóbulos rojos marcados con  $C^{14}$ , sensibilizados, así como con  $Fe^{59}$  y  $Cr^{51}$ ; también inyectaron Hb marcada, en solución, y grupo Hem. Las Hb intra y extracorpúscular fueron convertidas a bilirrubina en proporciones similares. Con glóbulos rojos sensibilizados, solo del 63-80% del hem administrado pudo ser recuperado en la bilis como bilirrubina  $C^{14}$ , lo que hacía suponer que una parte del Hem era derivado a otros productos anteriores distintos de la bilirrubina.

Mediante estudios realizados con glicina y ácido delta-aminolevulínico marcados, se sabe que un 11% aproximadamente de la bilirrubina producida en el organismo es de procedencia extraeritrocitaria.

En 1.961, Watson aportó el caso de un paciente con anemia aplásica, con aparente incremento en la excreción precoz de estercobilina marcada, sugiriendo que ésta fracción debería proceder de fuentes no relacionadas con la eritropoyesis (99), dato que fue confirmado por estudios posteriores. Así, entre otros casos, Israel y col. encontraron, con glicina- $C^{14}$ , formación muy precoz de bilirrubina: un primer componente a las 24 horas, no relacionado con la eritropoyesis; un segundo componente, máximo a los 3-5 días, que variaba con la eritropoyesis. Otras veces se empleaba la glicina- $N^{15}$ . Utilizando ácido delta-aminolevulínico- $C^{14}$  o  $H^3$  (ALA- $C^{14}$ , ALA- $H^3$ ) aún se detectó bilirrubina más precozmente, a la 1-2 horas, no influenciada con la eritropoyesis. Esta derivaría de precursores del Hem, no incluyéndose en la formación de Hb. Dicha eliminación precoz disminuía con la hepatectomía subtotal, lo que hacía pensar aún más en un origen extraeritrocitario de la bilirrubina, incluso extramacular, en el propio hígado (Robinson: J. Lab. Clím. Méd. 73:668 1969 "Incrementada formación de bilirrubina de fuentes no hemoglobínicas en ratas con desórdenes del hígado."). A continuación del aumento del Hem hepático, al mejorar la función de éste, había aumentado la bilirrubina mar-

cada en la bilis. Las fuentes metabólicas de la fracción de bilirrubina de origen hepático no han sido identificados con certeza; Schmid y col. sugirieron los citocromos microsomales P450 y b5, a la vista del marcado aumento de ambas enzimas en la formación de bilirrubina marcada precoz en las ratas tratadas con fenobarbital.

El Hem de la Hb insuficientemente utilizada o fabricada en exceso en relación con las necesidades eritropoyéticas, degradandose antes de incorporarse al hematíe en la médula ósea, puede derivar a bilirrubina. Se ha dado gran importancia al concepto de "eritropoyesis ineficaz" (97, 99), que justificaria hiperbilirrubinemias de indirecta en ciertos cuadro clínicos sin evidencias de auténtica hemolisis (anemia perniciosa, talasemia, anemia normoblástica refractaria, etc.). Cuando ocurre una gran hemorragia, con intensa repercusión en la hiperplasia medular, la eritropoyesis acelerada puede distorsionarse, y dar lugar a una eritropoyesis ineficaz, con gran eliminación precoz de bilirrubina-C<sup>14</sup>, lo que se atribuye a insuficiente aprovechamiento del Hem, por falta de hierro, derivandose el mismo a la formación de bilirrubina.

Puede tambien la bilirrubina derivar de tetrapirroles cíclicos directamente, y tal vez de tetrapirroles lineales y aún dipirroles.

Finalmente, la bilirrubina puede derivar de la degradación de otras hemoproteínas (mioglobina, catalasa, citocromos, etc.).

Todas esas fuentes no eritrocíticas de la bilirrubina, que normalmente tiene escasa importancia, pueden revestir gran interés en ciertas circunstancias patológicas, determinando estados hiperbilirrubinémicos clínicamente manifiestos. Estas situaciones, muy bien estudiadas por Israel y Zipursky (66) Yamamoto (130), Israel y Yamamoto (65), Robinson (97,98), Kiyoyasu Nagai (69), Arias (4), etc. dan lugar a los llamados "shunt hiperbilirrubinémicos", primarios o secundarios, caracterizados por hiperbilirrubinemias de indirecta, en general moderados, normal o casi normal supervivencia eritrocitaria y aumentada excreción de urobilinógeno.

Como dijimos al principio la formación de bilirrubina tiene lugar en el S.R.E., no siendo indispensable el hígado para ello,(27). El di-

cho clásico "no hay ictericia sin hígado" no tiene razón de ser; ésto nació a raíz de los trabajos de Minkowsky y Naunyn que no lograron producir ictericia en gansos hepatectomizados tras la inyección de hidrógeno arsenical en 1896, aunque sí se producía en el ganso íntegro. Pero en 1.913, Wipple y Hooper lograron producir ictericia en el perro a pesar de excluir el hígado de la circulación. Entonces Mc Nee repitió los experimentos de Minkowsky y Naunyn, y llegaron a la conclusión de que la no producción de ictericia se debía, no a la supresión del hígado, sino a la supresión del S.R.E. que con la hepatectomía tenía lugar. Estudios de Mann concluyeron en forma similar y en la actualidad se acepta el origen extrahepático de la bilirrubina. Se forma en el S.R.E. principalmente de hígado, médula ósea y bazo. La formación de bilirrubina de la sangre extravasada es una fácil y buena prueba de la no indispensabilidad del hígado para producir bilirrubina y, por consecuencia, ictericia. No conozco trabajos, y sería interesante, de si se logra producir ictericia en animales con hiperhemólisis, o inyectándoles hemoglobina, a los que se le haya bloqueado el S.R.E.

### CIRCULACION DE LA BILIRRUBINA EN EL PLASMA.-

La bilirrubina formada por una u otra vía, pase a la sangre, donde se la encuentra en concentraciones normales entre 0,2 y 1 mgr. %.

En la figura 4 podemos ver la estructura química de la bilirrubina. Es un pigmento amarillo, soluble libremente en muchos disolventes orgánicos, pero muy exactamente soluble en soluciones acuosas a PH fisiológico (107). Es débilmente ácida, por lo que es libremente soluble con las bases. La adsorción máxima de bilirrubina está en la banda de longitud de onda 450  $\mu$ u del espectro visible, propiedad que puede ser usada para ensayos con espectrofotometría directa; sin embargo, se obtienen medidas más exactas, y específicas por acoplamiento del pigmento con ácido sulfanílico diazotizado (dialzo-reacción de van den Bergh, que produce un derivado de color morado con un bien definido pico de adsorción en la longitud de onda de 540  $\mu$ u (107).

Respecto a su naturaleza química, no hay diferencias significativas, cualitativa ni cuantitativamente, entre la bilirrubina sérica y la que se aísla de la bilis (81) aunque sí en lo que se refiere a su comportamiento fisiológico, como ya veremos más adelante. Hay fuerte evidencia de que la bilirrubina, que llamaremos de reacción directa, es un metal complejo (81).

Vamos a comentar algo detenidamente la solubilidad de la bilirrubina, propiedad que va a importar mucho en su fisiología, especialmente en su relación con la conjugación hepática y con la eliminación renal, esto último de gran interés para nosotros.

Como hemos adelantado antes, la bilirrubina es difícilmente soluble en medio acuoso. Al menos, esto es lo que se ha admitido siempre. Pero Burnstine y Schmid (34) estudiaron la solubilidad de la bilirrubina en soluciones acuosas libres de proteínas, en buffers de diferente fuerza iónica y PH, encontrando que, a concentraciones salinas aproximadamente las del líquido extracelular, la bilirrubina es bastante más soluble de lo q

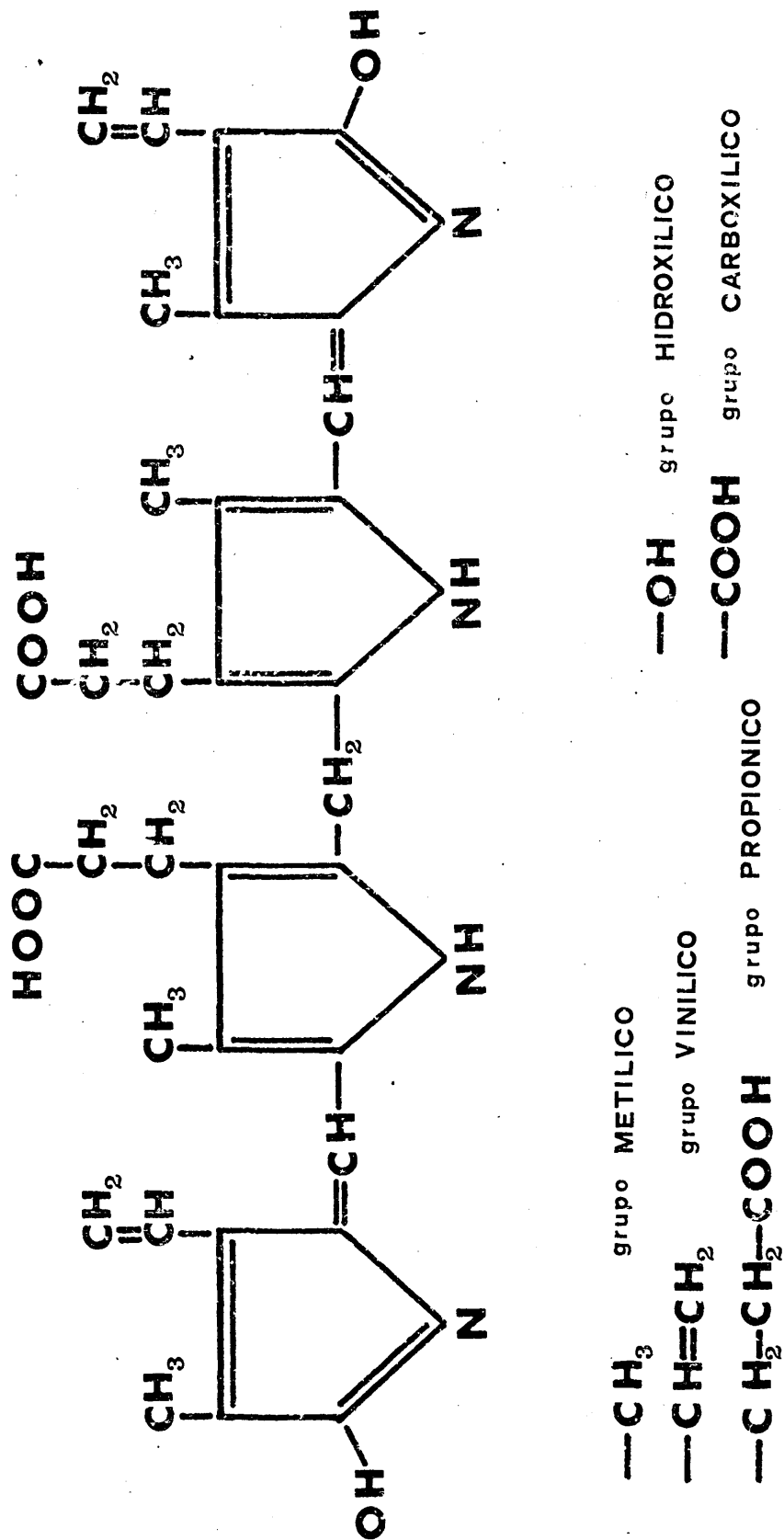


FIG. 4.- BILIRRUBINA.



hasta aquí se había admitido: concluyeron en que la solubilidad de la bilirrubina en medio acuoso dependía del PH y de la fuerza iónica, y que esto podría explicar también la aparición de "infartos de bilirrubina" en la médula renal de niños hiperbilirrubinémicos, por descenso local del PH. Esta gran dependencia del PH del medio de la solubilidad de la bilirrubina, ya fué evidenciada por Barac (11), quien observó que al PH fisiológico de 7,35 y con mayor razón a PH 7, era imposible disolver 1 mgr. de bilirrubina en 1 litro de agua; pero bastaba añadir al medio pequeñas cantidades de albúmina para que, a los mismos PH, la solubilidad fuese total, dando soluciones estables, ópticamente vacías al ultramicroscopio, a concentraciones relativamente elevadas. La orina de ictericos contiene bilirrubina en estado cristalino (113), pero las moléculas son todavía groseras, de tal forma que al ser ultrafiltradas, dependiendo del tipo de membrana de colodión utilizado, el ultrafiltrado contiene mayor o menor cantidad de las referidas partículas suspendidas de bilirrubina. Sin embargo, otros autores (53) han comunicado solubilización de la bilirrubina, a PH de 7,4 y fuerza iónica de 0,15, en medio exento de proteínas, a la concentración de 5 mgr. de bilirrubina por 100 c.c. Elevando el PH a 8,4, etc. la solubilización de la bilirrubina se hace casi completa, pero este mecanismo no puede ser utilizado por el organismo, por estar situado el PH fisiológico a cifras muchos más bajas. También se solubiliza algo la bilirrubina uniéndose a urea, citratos, ácidos biliares, etc. Una pequeña fracción de la bilirrubina conjugada del plasma de perros y pacientes con ictericia obstructiva es dializable, siendo probablemente la fuente de la bilirrubina urinaria; es retenida en el plasma de enfermos o perros urémicos (56), interpretándose por su unión a ciertos aniones orgánicos (urea).

De todas formas, la bilirrubina, en líneas generales, es poco o nada soluble en medio acuoso, por lo que, para su circulación en el plasma sanguíneo, ha de recurrir a medios de solubilización, siendo principalmente dos los mecanismos empleados: la unión a las proteínas plasmáticas y la

unión, mediante la conjugación hepática, al ácido glucurónico. Esta apariencia evolucionaria de los referidos mecanismos de solubilización parece ser atribuible al desarrollo filogenético de las especies en medio seco (tierra). Las formas de vida acuáticas no mamíferas generalmente no poseen albúmina plasmática ni un aparato de conjugación en acción, disponiendo de bilirrubina por la difusión directa a través de superficies lipídicas (branquias, piel). En el desarrollo del feto de los mamíferos (en el medio acuoso placentario), estos pasos filogenéticos son recapitulados: la placenta substituye a las branquias como una membrana semipermeable a través de la que el pigmento no conjugado difunde y así es removido del organismo fetal (107). Otros organismos filogenéticamente inferiores no parecen necesitar dichos mecanismos, por cuanto la bilirrubina no está presente en sus metabolismos, como puede ocurrir con los organismos unicelulares, aunque esto último es cuestionable, ya que recientes trabajos de autores rusos (52) han demostrado la presencia de pigmentos biliales (biliverdina) en el seno de ciertos microorganismos: la levadura *Candida lipolytica* y el protoctinomiceto *Nocardia erythropolis*; el contenido de biliverdina en los mismos depende de la concentración de hierro del medio.

De estos dos medios principales de solubilización de la bilirrubina sérica, su unión a las proteínas plasmáticas y su conjugación con el ácido glucurónico, hablaremos aquí del primero, tratando el otro al referirnos al apartado de la conjugación hepática de la bilirrubina.

De todas las proteínas plasmáticas, es sin duda la albúmina la proteína transportadora fundamental (4, 11, 20, 29, 34, 53, 62, 79, 81, 86). Ya hemos dicho anteriormente, cómo la simple adicción de albúmina a medios acuosos conteniendo bilirrubina, consigue la rápida solubilidad de la misma, incluso a elevadas concentraciones (11).

El suero de humanos y ratas, suplementado in vitro con bilirrubina- $C^{14}$ , fué analizado por flujo continuo y electroforesis en bloque de almidón (87); los mismos estudios realizados con el suero obtenido después de la administración intravenosa de bilirrubina marcada o de glóbulos rojos

sensibilizados y marcados. En todos los casos, a concentraciones fisiológicas de la capacidad de unión de las proteínas séricas, la bilirrubina marcada migra solamente con la albúmina. Con suero humano contenido por encima de dos moles de bilirrubina- $C^{14}$  por mol de albúmina, el pigmento era virtualmente indializable a PH 8,6, lo que indicaba casi completa unión protéica. A más altas concentraciones de bilirrubina- $C^{14}$ , cantidades significativas de ésta apareció en el dializado, en forma de pigmento hidrosoluble. Estos mismos autores observaron en otros trabajos (57) que en el suero bisalbuminémico, ambos picos de albúmina unían similares cantidades de bilirrubina- $C^{14}$ . Dializando a PH 8,6, no pareció virtualmente ninguna radiactividad en el dializado de suero normal con un contenido de 4,9 gr% de albúmina y más de 70 mgr% de bilirrubina- $C^{14}$ ; sin embargo, si la concentración del pigmento era más alta, o si la bilirrubina era expuesta a un álkalí antes de la mezcla con el suero, alguna radiactividad era detectada en el dializado, y la electroforesis revelaba ahora un pequeño pico del isótopo, marcado, material diazo-negativo, en la zona inter alfa-globulina. Esto último también fué observado en el suero analbuminémico suplementado con 0,8 mgr% de bilirrubina- $C^{14}$ . De modo que, a concentraciones fisiológicas, toda la bilirrubina es transportada por la albúmina.

De si la albúmina era o no la única proteína que unía a la bilirrubina, se han publicado numerosos y hasta contradictorios trabajos. Todos están de acuerdo de que es la proteína fundamental y desde luego la única en condiciones fisiológicas. Pero en casos de Hiperbilirrubinemias severas, muchos autores han encontrado bilirrubina unida a las alfa-globulinas, sobre todo la alfa<sub>1</sub>-globulina de la fracción V-I de Cohn's (70); estos autores encontraron que ambas fracciones de la bilirrubina, conjugada y no conjugada, están firmemente unidas a la albúmina a PH entre 6 y 9, y separadas de ellas a PH inferior a 5. Diremos, de paso, el interés de este hallazgo en la explicación del diferente comportamiento, en la reacción de van den Bergh (59,70), de ambas fracciones bilirrubínicas,

clasicamente atribuido a la fracción proteica; pero esta explicación no es posible, por cuanto la reacción de van den Bergh tiene lugar a PH 4, valor en el que ambas bilirrubinas están ya separadas por ese motivo, de la correspondiente fracción proteica, por lo cual hay que atribuir el diferente comportamiento a la diferente solubilidad de las respectivas fracciones de bilirrubina, siendo más soluble la forma conjugada, dando la reacción "directa". La misión del tratamiento previo con alcohol, para la reacción "indirecta", es porque aquél aumenta la solubilidad de la bilirrubina no conjugada y puede así, a continuación, reaccionar con el reactivo de van den Bergh.

Algunos autores, en casos de intensa hiperbilirrubinemia, han encontrado bilirrubina unida a las alfa<sub>2</sub>-globulinas y aún las beta-globulinas (14). Estos autores añaden, además, que la gran afinidad de unión de la bilirrubina por la albúmina justifica, por sí sola, la no existencia de bilirrubina libre en el plasma, unido ello a su mala solubilidad en medio acuoso. Otros autores (79) no encontraron jamás bilirrubina unida a las beta-globulinas, aunque sí, además de a la albúmina, a las alfa<sub>1</sub>-globulinas, en marcadas hiperbilirrubinemias. Utilizando electroforesis en agarosa y por ultracentrifugación, se ha comprobado que el transportador de la bilirrubina en la zona de las globulinas es una beta-lipoproteína (53). La importancia fisiológica de esta pequeña fracción de unión no se ha determinado, pero puede ser un factor importante en la capacidad de unión del suero, particularmente en el periodo de recién nacido, cuando la concentración de lipoproteínas del plasma es baja. Esta unión a las globulinas parece ser más importante en las ictericias marcadas.

Todos los autores están de acuerdo en que la bilirrubina no se une con otras fracciones proteicas del plasma, tales como las gamma-globulinas y el fibrinógeno.

La unión de la bilirrubina a la albúmina es más fuerte para la forma no conjugada que para la conjugada.

Cada molécula de albúmina une, por lo menos, dos moléculas de bilirrubina. La cantidad de bilirrubina no conjugada que puede ser fijada

oscila de 60-80 mgr% (62). Algunos autores (79) admiten la unión de 3 moles de bilirrubina a 1 mol de albúmina; otros (121) refieren que la máxima variación del número de moléculas de bilirrubina que pueden ser fijadas a 1 mol de albúmina está al rededor de 3.3 a 37°C y esta razón molar no es significativamente alterada por cambios de PH que oscilen de 7,2 a 8,8.

La bilirrubina unida a la albúmina no es dializable a través de las membranas celulares (9,11,14,53,54,62,82,107,119,121,125,126), por lo que la albúmina tiende a retener el pigmento dentro del compartimento plasmático, limitando de este modo la acumulación de cantidades del mismo potencialmente peligrosas para los tejidos. Ello hace necesaria la separación de la bilirrubina de la albúmina para ser captada por el hepatocito o ser eliminada por el riñón. Por esta misma razón es difícil la presencia de la bilirrubina en ciertas secreciones orgánicas, como el sudor, lágrimas, saliva, jugo gástrico (125). El comportamiento de la leche en la ictericia pronunciada de la madre no es bien conocida. El L. C. R. está libre de bilirrubina, salvo en casos de prolongada y severa ictericia, o en circunstancias patológicas que alteran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Algo parecido ocurre con el humor acuoso del ojo, que excepcionalmente se tiñe dando lugar a la xantopsia o visión amarilla, aunque ésta también puede deberse a otras causas (bilirrubina de la córnea, vasos o linfáticos de la retina). El paso a otros tejidos, como la piel, se hace unida a la albúmina o a otras proteínas, por ejemplo la elastina en el caso concreto de la piel. Su presencia en otros tejidos, como miocardio, pulmón, cerebro, es escasa o ausente.

La unión de la bilirrubina con la albúmina es más intensa para la forma no conjugada, lo que hace que ésta sea prácticamente indializable, siendo casi nula su presencia fisiológica en la orina (9,54,56,126). Este hecho defiende a los tejidos de la acción tóxica de la bilirrubina no conjugada; así, cuando dicha capacidad de unión (ya dijimos que para la bilirrubina no conjugada, la máxima capacidad de unión era de 60-80 mgr.%, (62) es sobre pasada, la bilirrubina no conjugada puede emigrar a los teji-

dos y ejercer su acción tóxica (encefalopatía bilirrubínica). Ciertos aniones orgánicos pueden competir con la bilirrubina en su unión con la albúmina (62,82,121), como ocurre con las sulfonamidas, salicilatos, tiroxina, ácidos grasos libres, oxitetraciclinas, etc., desplazando a aquélla de la proteína transportadora. Este hecho es de gran interés clínico, ya que administración de dichas sustancias en sujetos con severa hiperbilirrubinemia no conjugada, puede determinar una migración de aquélla a los tejidos, especialmente al cerebro por ser liposoluble, precipitando la aparición del kernicterus; en un grupo de recién nacidos letérgicos (62) se comprobó que la administración de gantrisona desencadena la aparición de kernicterus a concentraciones de bilirrubina plasmática más baja que las requeridas para la aparición de este síndrome. Watson (121) opina que no se produce bilirrubina libre (disociada), sino que, al menos los salicilatos, facilitan la separación de la bilirrubina de la albúmina y su unión a la lipoproteína celular, por lo que, al administrarlos, los niveles de bilirrubina plasmática caen rápidamente, pasando a los tejidos. También tienen esta propiedad el taurocolato sódico y la cafeína (121). Igualmente la elevada concentración de benzoato sódico e hidrogeniones (82), como ocurre en la acidosis metabólica o respiratoria, puede desencadenar la encefalopatía bilirrubínica. Por el contrario, las transfusiones de albúmina eliminan este riesgo, haciendo soportar más altas concentraciones de bilirrubina (82,121); en la hipoalbuminemia de niños prematuros o en otras circunstancias clínicas asociadas, puede presentarse también el riesgo del kernicterus.

La disociación de la bilirrubina de la albúmina y su emigración a los tejidos, como acabamos de exponer, es bien conocida y prácticamente era la única actividad tóxica que se le atribuía hasta ahora a la bilirrubina. Sin embargo, desde los primeros acontecimientos del kernicterus humano y en estudios de hiperbilirrubinemia experimental en animales, las complicaciones hemorrágicas fueron bien conocidas pero pobremente entendidas. En este sentido, Maurez y Caul (80) realizaron estudios que demostraron que la bilirrubina no conjugada y no unida a la albúmina (bilirrubina libre),

a bajas concentraciones, 0,5 mgr.%, origina tinción amarillenta y agregación de plaquetas lavadas humanas, mientras que la bilirrubina unida a la albúmina y la bilirrubina alterada por exposición a la luz solar, tiene pocos o ninguno de estos efectos sobre las plaquetas; este fenómeno requería iones calcio y su efecto se acentuaba por la adición de iones potasio. En el medio de cultivo, donde se colocaban plaquetas y bilirrubina, tenía lugar liberación de difosfato y trifosfato de adenosina. Parece ser que la causa de esta agregación plaquetaria es el ADP liberado por las plaquetas por acción de la bilirrubina libre fijada a la membrana lipídica de las plaquetas, que es transportada al interior por la albúmina o cualquier otra proteína citoplasmática. Los datos reseñados sugieren que la bilirrubina influye en la función plaquetaria e invita a especular el papel que pueda jugar en la producción de trombo- sis intravascular y/o hemorragia, sobre todo en severas hiperbilirrubinemias.

La bilirrubina circulante en el plasma y la que está fijada en los tejidos (ictericia) es susceptible a la acción de la luz solar. Esto es casi exclusivamente aplicable a la bilirrubina no conjugada. Callahan y col. (35), partiendo del hecho de que la bilirrubina in vitro, por acción de la luz solar, se degrada a derivados hidrosolubles y diazonegativos, inyectaron éstos a animales de experimentación, observándose mucha menor toxicidad que la bilirrubina no conjugada intacta, siendo rápidamente excretados en la bilis. Se había observado el efecto útil de la fototerapia en enfermos con hiperbilirrubinemia de "indirecta", pero se desconocían sus causas. Estos autores aplicaron la exposición a la luz solar, durante 12-15 horas, a dos niños con síndrome de Crigler-Najjar, de 5 a 7 meses de edad, encontrando una respuesta espectacular: la reducción de los niveles de bilirrubina. Durante la fototerapia, ambos pacientes fueron transfundidos con bilirrubina-C<sup>14</sup>. Se recogió y midió esta bilirrubina y sus derivados en plasma, bilis y orina. El niño de 5 meses llegó a 33 mg% de bilirrubina, teniendo que practicársele exaguinotransfusión repetidas veces; por último, se le aplicó

la fototerapia llegando a reducirse la bilirrubina a 11 mgr%. El segundo, de 7 meses, disminuyó la bilirrubina de 35mgr.% a 9 mgrr%. Ambos pacientes habían sido tratados también, previamente, con fenobarbital durante un mes, sin efecto notable sobre la hiperbilirrubinemia.

Este efecto de la luz solar sobre la bilirrubina tiene una doble vertiente práctica: por un lado, el interés terapéutico, ya extendido ya extendido por casi todos los hospitales del mundo. El otro, la necesidad de realizar con la mayor rapidez, después de su extracción, las determinaciones de bilirrubina en el laboratorio, no exponiendo las muestras a la luz, ya que, en tal caso, los resultados serían poco valorables. Quizá también aquí esté la explicación de la vieja creencia popular, hecho anecdótico, de que la ictericia disminuía "mirando las aguas del río, viendo a éstas pasar": imaginamos que solo ocurriría en los días soleados...



### CAPTACION DE LA BILIRRUBINA POR EL HIGADO.-

Aquí comienza la fase verdaderamente hepática de la eliminación de bilirrubina del organismo. Esta consta de tres etapas: a) Captación hepática de la bilirrubina, de la que nos vamos a ocupar a continuación. b) Conjugación de dicha bilirrubina por el hepatocito. c) Excreción, en el cálculo biliar, de la bilirrubina conjugada. De estas dos últimas nos ocuparemos en los apartados sucesivos correspondientes.

El proceso de captación hepática de bilirrubina implica la liberación de ésta de la proteína transportadora y subsiguiente penetración en el interior del hepatocito. Muy diversos trabajos se han ocupado de este aspecto de la captación hepática de la bilirrubina (4,5,20,24,30, 53,62,109).

El hígado es el órgano preferentemente capaz de transferir bilirrubina, bromo y otros aniones orgánicos, desde el plasma a las células parenquimatosas (53). Después de la administración intravenosa de bilirrubina marcada a la rata, a los 5 minutos el 65% de la dosis administrada se encuentra en el hígado y el 85% de ésta se encuentra asociada con la fracción sobrenadante del homogenizado de hígado. No se conoce bien el mecanismo de esta rápida y selectiva transferencia, pero en cualquier caso ello está determinado por el flujo sanguíneo hepático, aunque no solo por éste (5).

Esta relativa especificidad del hígado para captar determinados aniones orgánicos podría, teóricamente, residir en varios hechos:

- 1) Algunos autores opinan que la bilirrubina no conjugada, unida a la albúmina, llegaría en primer lugar a la célula de Küpffer, lo que fue observado por Arias en la sobrecarga con bilirrubina marcada no conjugada, así como por Díaz Rubio y col. (42,43) en la experimentación en ratas

sobrecargadas con bilirrubina no conjugada. Allí tendría lugar una separación de la albúmina y subsiguiente cesión de la bilirrubina al hepatocito.

2) Otros autores, como Cantarow (37), Díaz Rubio y colaboradores (42,43), opinan que, además de la separación de la albúmina por la célula de Küpffer, tiene lugar una monoconjugación de la bilirrubina por aquélla, cediéndola así al hepatocito para su ulterior diconjugación. Esta hipótesis fue concebida por el hecho de que en ciertos estados posthepatíticos se observaba un franco predominio de bilirrubina monoglucuronizada, coincidiendo con el hallazgo histopatológico encontrado por Popper y Schaffner (91,92), así como por Díaz Rubio y Sagura (42), del llamado fenómeno de la "capilarización del sinusoides", consistente en un espesamiento y fibrosis del espacio de Disse, secuela posthepática frecuente, que obturaba los estomas de los sinusoides, dificultando, al menos parcialmente, el paso de la bilirrubina desde las células de Küpffer al hepatocito, explicándose por este "efecto de barrera" aquél predominio de bilirrubina monoglucuronizada.

3) Otras opiniones sostienen que la captación de la bilirrubina se hace directamente a nivel de la cara sinusoidal de la membrana del hepatocito, disociándose la albúmina y pasando al interior copulada por otras preteínas.

4) El paso de la bilirrubina a través de la membrana del hepatocito no se hace por simple difusión iónica (5), por lo que otra posibilidad radicaría en propiedades directamente relacionadas con la constitución de dicha membrana.

5) En este sentido (5,53), la membrana plasmática de la célula hepática ha sido aislada casi pura, por centrifugación diferencial, habiendo sido analizada su composición química y enzimática. Aunque algunos aspectos de su composición son similares a los observados en membranas aisladas de otros tejidos, se ha observado citoquímicamente una actividad enzimática heterogénea, así como una diferente degradación de las proteínas de la membrana. Esta no es molecularmente homogénea y pudieran existir en ella transportadores específicos para diversos aniones orgánicos, aunque tales identificaciones no se han realizado. La unión de la bromo por la membrana plasmática del hepatocito es competitivamente inhibida por el verde indocianina, ácido flavaspídico y yodipamida, los cuales compiten con aquélla en su captación he-

pática en el vivo. El descubrimiento de una mutante de oveja Southdown, con defecto funcional en el transporte de algunos aniones orgánicos desde el plasma a la célula hepática, permite la investigación del papel de las membranas plasmáticas en el proceso de captación.

De todas formas, no está demasiado claro que la membrana juegue un papel esencial en la captación de la bilirrubina, habiendo adquirido últimamente mayor trascendencia el descubrimiento ciertos componentes citoplasmáticos del hepatocito para explicar aquélla.

6) Desde 1964 ha sido reconocido que la bilirrubina, en el citoplasma de las células hepáticas, está unida a proteínas distintas de la albúmina (5,30,53), por las siguientes razones:

a) La concentración de bilirrubina en el sobrenadante de homogeneizado de hígado excede, en mucho, el límite de solubilidad del pigmento a PH fisiológico.

b) Aunque la bilirrubina está unida a la albúmina en el plasma, solamente pequeñas cantidades de albúmina están presentes en las células hepáticas.

c) La tasa de transferencia de bilirrubina del plasma al hígado es mayor que la correspondiente tasa de transferencia de la albúmina.

Los primeros intentos de aislar las proteínas citoplasmáticas de unión a la bilirrubina utilizaron la cromatografía de cambio iónico, basada en la premisa de que el anión orgánico estaba firmemente unido a aquéllas, no siendo productivos estos estudios. Pero se consiguió con la técnica de la cromatografía en gel-filtración, que separa proteínas sobre la base del peso molecular y no de la carga iónica, aislandose dos fracciones protéicas, designadas Y y Z, del citoplasma de las células hepáticas (Levi, Gatmaitan y Arias, ). Estos autores, aplicando la referida técnica en Sephadex G-75, lograron evidenciar dichas fracciones protéicas; su selectiva unión a la bilirrubina, bromo, verde indocianina, etc. fue demostrada. La evidencia de que estas dos proteínas son determinantes importantes de la captación hepática selectiva de aniones orgánicos, se basó en los siguientes argumentos:

a) Mediante técnicas dignas de crédito, ambas proteínas solo han sido encontradas juntas en el hepatocito.

b) No se las encuentra en las células de Küpffer

c) Ciertas drogas, como ácido flavaspídico y bunamiodil, empeoran la captación de bilirrubina y bromo in vivo por competir con su unión a la proteína Z.

d) La administración de fenobarbital, insecticidas (DDT, dieldrín) y otras drogas (benzopizeno) a ratas, aumenta la captación hepática de la bromo in vivo, por originar aumento de las concentraciones de proteína Y en más del 300%, proliferación del retículo-endoplásmico liso de los hepatocitos y de otras proteínas asociadas con la hidroxilación (lisosomas), así como estimulación del transporte electrónico microsomal. En consonancia con todo ello, los aclaramientos de bilirrubina, bromo, etc., se elevan (5).

e) Estudios del desarrollo de las proteínas Y y Z en cerdos de Guinea y en monos Rhesus, revelan déficit de la Y, la mayor fracción proteica, en los fetos y animales recién nacidos. La Z está baja en los fetos prematuros y aumenta al nacer, hasta conseguir valores del adulto. En monos que manifiestan ictericia fisiológica del recién nacido, la maduración de la concentración de proteína Y coincide con la maduración de la captación hepática de la bromo y con la disminución de la ictericia fisiológica.

f) Demostración directa, in vitro, de la unión de los referidos aniones orgánicos a las proteínas Y y Z.

g) Estudios filogenéticos revelan ausencia de Y y Z en hígado de pescados y anfibios de respiración branquial, existiendo grandes cantidades de ambas en anfibios de respiración aérea, reptiles, aves y mamíferos; la misma metamorfosis del renacuajo está asociada con la aparición de la proteína Y.

El monómero de la proteína Y tiene un peso molecular de 22.000 y su dímero 44.000, habiendo sido aislado puro. Su velocidad de sedimentación es de 3,5 S y su punto isoeléctrico es de 8,7. Por técnicas de inmunodifusión, inmunofluorescencia, etc. se la ha encontrado en hígado, riñón y mucosa del intestino delgado; estuvo ausente en otros 16 tejidos estudiados (5) y en la membrana lavada del hepatocito.

La proteína Z tiene un peso molecular de 9 a 10.000.

Ni la Y ni la Z contienen ácido nucleico.

Y y Z no son específicamente unificadoras de la bilirrubina. Otros aniones se benefician (ya citados), además de hormonas (tiroxina, cortisol), drogas (ácido flavaspídico, salicilatos), metabolitos (ácidos grasos libres, piruvatos), agentes colecistográficos (yodipamida, bunamiodil), pigmentos (bromo, verde indocianina), etc. pero la máxima unión es para la bilirrubina (85%).

Y y Z pueden estar ausentes en ciertos estados hiperbilirrubinémicos no conjugada, como la ictericia del recién nacido, enfermedad de Gilbert, etc. (5)

Para una mejor comprensión de la distribución de la bilirrubina dentro del hepatocito, Brown, Grodsky y Carbone (30) inyectaron cantidades fisiológicas de bilirrubina tritiada (marcada con  $H^3$ ) a ratas normales, determinando su concentración en el plasma, fracciones subcelulares del hígado y bilis, a intervalos de 2,5,15,30, y 60 minutos, durante las fases de captación y excreción. A los 5', el 50% de la dosis inyectada (excluyendo la bilirrubina  $H^3$  atrapada en el suero) estaba en el hígado, a una concentración muy superior a la del plasma, demasiado alta para deberse a una transferencia unida a la albúmina. No se observaron diferencias en la distribución del isótopo en las fracciones subcelulares, dependiendo primariamente de la concentración de bilirrubina intracelular. Cantidades significativas de bilirrubina- $H^3$  se acumularon dentro de los microsomas, así como en la fracción rica en hidroxilasa ácida (lisosomas), pero no en las fracciones mitocondriales o nucleares. Que la bilirrubina intrahepatocitaria no está asociada a la albúmina, se demuestra por la observación de que la distribución subcelular de la bilirrubina, en cualquier tiempo, es groseramente diferente de la distribución subcelular de la albúmina, medida en la rata por Peters. Además, es inversíml que la bilirrubina subcelular esté unida a la albúmina por cuanto la concentración de ésta es solamente de 55  $\mu\text{g}/\text{gr}$  hígado, una cantidad con máxima capacidad de unir 1  $\mu\text{g}$  de bilirrubina.

No obstante, los argumentos anteriores no excluyen definitivamente la existencia de un pequeño pool intracelular de albúmina citoplasmática en rápido equilibrio con la albúmina sérica. La bilirrubina podría ser trans-

portada dentro de la célula por la albúmina y aclarada intracelularmente, cambiando con nueva bilirrubina portada por la albúmina sérica; de esta manera, grandes cantidades de bilirrubina podrían ser transferidas al retículo-endoplásmico portados por la albúmina, aunque la cantidad total de ésta, detectable por la distribución de la albúmina marcada con  $I^{131}$ , es baja (30).

Se conoce poco de la cesión de la bilirrubina al retículo-endoplásmico, por las proteínas Y y Z, para su ulterior conjugación. El retículo-endoplásmico liso se enriquece en bilirrubina tritiada después de la administración de fenobarbital (5).

Por todo lo antedicho, se propuso entonces que, la transferencia de la bilirrubina y otros aniones orgánicos, supondría la disociación del anión de las proteínas plasmáticas, difusión no iónica de los componentes liberados a través de la membrana hepatocitaria y subsiguiente unión a las fracciones Y y Z. Una segunda posibilidad podría ser que los receptores de la membrana puedan determinar una especificidad para la captación de aniones orgánicos y las proteínas aceptoras protoplásmicas unir dichos aniones no específicamente. En relación a ésta última hipótesis se observó en mutantes de ovejas Southdown, que tienen alterada la captación hepática de varios aniones orgánicos, que la cantidad de proteínas Y y Z era normal (53).

Así, en su más simplificada forma estática, el sistema puede ser descrito como un compartimento extracelular (plasma) y uno intracelular (hepatocito), separados por una membrana que es permeable a la bilirrubina libre, pero no a la unida a la albúmina. En este sistema, el equilibrio del pigmento entre el compartimento hepatocitario y el plasmático sinusoidal, dependería primariamente de las fuerzas de unión relativas a ambos lados de la membrana, muy superior para el lado hepatocitario, en relación al plasma y a otros tejidos (109). De esta suerte tiene lugar esa evidente y especial selectividad de hepatocito para captar la bilirrubina y otros aniones orgánicos del plasma.

Existen en la clínica situaciones de ictericia que reconocen, como causa de hiperbilirrubinemia, un déficit de captación del pigmento por el

hígado. Ya lo hemos visto para ciertas drogas, por acción competitiva en su unión a las proteínas Y y Z (5,21,24,40,53,109); también acontece algo similar en la enfermedad de Gilbert (17,19,23,42,72,93,94,) y en ciertas cirrosis hepáticas (110), etc. aunque no siempre se debe a un mecanismo aislado, pudiendo coexistir un déficit de captación y conjugación, o de excreción, o múltiple, etc. En cualquier caso interesa conocer algún medio de detectar dicho defecto de captación en la clínica, para lo que se utiliza, fundamentalmente, la curva de aclaramiento de la bromo (6,19,72,97,114, 125,129) así como la curva de aclaramiento de la bilirrubina- $C^{14}$  ambas administradas intravenosamente y determinando su concentración plasmática a diferentes espacios de tiempo. Como quiera que estos procedimientos nos hablan también de la excreción de la bilirrubina, los comentaremos más adelante.

TRANSPORTE INTRAHEPATOCITARIO DE LA BILIRRUBINA NO CONJUGADA.-

Una vez captada la bilirrubina por el hepatocito, debe ser transportada hasta el reticulo-endoplásmico para su conjugación. Poco se sabe sobre este aspecto, siendo más conocida la segunda fase del transporte intrahepatocitario, esto es, de la bilirrubina ya conjugada, desde el reticulo-endoplásmico hasta el polo biliar del hepatocito, para su excreción (24).

Hipotéticamente, se admiten los mismos mecanismos ya enumerados para la captación. Se supone que el transporte desde la membrana plasmática del hepatocito al reticulo-endoplásmico se hace por unión de la bilirrubina a las proteínas citoplásmicas Y y Z, ó, alternativamente, unida, como se dijo, a albúmina citoplásmica del hepatocito, en rápido cambio, esto último muy poco probable.



### CONJUGACION DE LA BILIRRUBINA.-

Esta es la etapa fundamental del metabolismo de la bilirrubina y por ésto multitud de trabajos han sido publicados acerca de este tema (4,5,16,20,22,24,53,62,63,67,84,94,96,103,104,105,106,107,109,111,112, 113,124).

La bilirrubina que circula normalmente por el plasma (27,42) está constituida fundamentalmente por la llamada "bilirrubina no conjugada o de reacción indirecta"; es insoluble, como ya dijimos en solución acuosa a PH ácido o neutro, siendo, por el contrario, soluble en cloroformo y disolventes de lípidos. Por otro lado, la bilirrubina presente en la bilis está constituida fundamentalmente por la llamada "bilirrubina conjugada o de reacción directa", es soluble en medio acuoso e insoluble en los disolventes orgánicos. Otras propiedades fisicoquímicas y biológicas diferencian ambos tipos de bilirrubina: la directa está presente en la bilis y en la orina, no muestra afinidad por el tejido cerebral, es fácilmente oxidable, se la encuentra en plasma preferentemente en la ictericia obstructiva y hepatitis, se une fácilmente a las proteínas desnaturalizadas, es poco fotosensible y da la reacción directa de van den Bergh. Por el contrario, la bilirrubina indirecta no aparece significativamente ni en la orina ni en la bilis, muestra gran afinidad por el tejido cerebral, es difícilmente oxidable, se la encuentra en el plasma preferentemente en la ictericia hemolítica, no se une a las proteínas desnaturalizadas, es muy fotosensible y da la reacción indirecta de van den Bergh.

¿Qué le ha sucedido a la bilirrubina a su paso por el hígado para transformarse en un pigmento de tan diferente comportamiento?. En esencia, una hidrosolubilización del pigmento.

En 1954, Cole, Latho y Billing (20) sometieron filtrados, exentos

de proteínas, de suero ictérico a una partición cromatográfica de inversión de fases. Así pudieron separar una bilirrubina de reacción indirecta y desplazamiento lento de un pigmento de reacción directa y migración rápida. Vuelta a realizar partición cromatográfica de ésta última, se separaron dos componentes, denominados pigmento I y pigmento II, muy inestables, estabilizándose con el reactivo diazoico; se comprobó que el pigmento I proporcionaba azopigmento A y B, mientras que el pigmento II solo proporcionaba azopigmento B. El pigmento I era bilirrubina monoglucuronizada y el pigmento II, bilirrubina diglucuronizada. Hoy día, sin embargo, se duda de la auténtica existencia del pigmento I (53,124) creyéndose que se trata de una mezcla de bilirrubina no conjugada y bilirrubina diconjugada. La bilirrubina no conjugada, solo proporciona azopigmento A.

Desde los trabajos de Billing y Lathe (20), así como los de Talaftant y Schmid (104) se sabe que la conjugación de la bilirrubina por el hígado se hace fundamentalmente con el ácido glucurónico (105). Dicho proceso tiene lugar en la fracción microsomal del hepatocito, y consiste, en esencia, en la transferencia del ácido glucurónico desde un donador, el ácido uridindifosfatoglucurónico (U.D.G.A.) a un receptor (hidróxido, carboxido, amino o sulfhidrilo) por acción de una enzima microsomal, la glucuroniltransferasa. Según Billing y Lathe, los procesos bioquímicos ocurrirían como indica la figura 5.

En analogía con otros ejemplos de formación glucurónica, la unión glucosídica tiene lugar a nivel de los grupos hidroxílicos de la bilirrubina, alfa y alfa prima (104). Otros autores, como Billing, Cole y Lathe, así como Schachter (103), opinan que la unión con ácido glucurónico se hace a nivel de los grupos carboxilos de la bilirrubina. Los carboxil-glucuronidos (acil-glucuronidos) pueden ser diferenciados de otros glucuronidos (como hidroxí-glucuronidos) por la capacidad que tienen de reacción con la hidroxilamina dando ácidos hidroxamínicos y ácido glucurónico. Schachter (103), trató bilirrubina directa (obtenida con la orina de pacientes con ictericia obstructiva) con hidroxilamina a PH7 y temperatura ambiente, durante 30 minutos, dando lugar a la formación de cantidades apreciables de hidroxamato de azopigmento B, derivado de la bilirrubina diglucuronizada. Esta reacción,

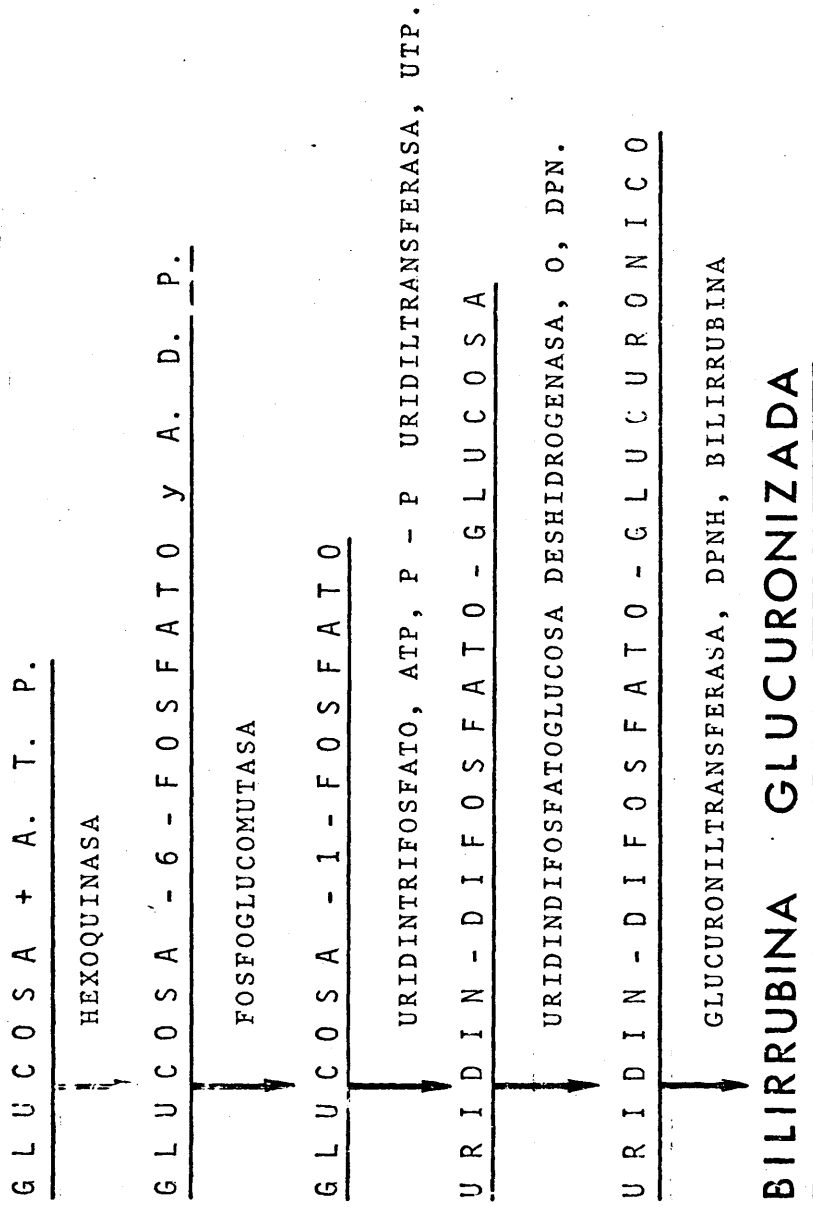


FIG. 5

CONJUGACION GLUCURONICA DE LA BILIRRUBINA

que es específica de los derivados acil-glucurónidos (carboxilos), proporciona una confirmación directa de que la bilirrubina está conjugada con el ácido glucurónico a través de sus grupos carboxilos (fig. 4).

La conjugación glucurónida puede realizarse con una molécula de ácido glucurónico o con dos, dando lugar a las fracciones mono y di-glucuronizadas de la bilirrubina. Sin embargo, así como la conjugación diglucurónica parece ser exclusiva del hígado, no ocurre lo mismo con la conjugación monoglucurónica, puesto que se ha observado en perfundidos de riñón, bazo, músculo, médula ósea y mucosa intestinal.

Bollman y Mann advierten que la cantidad de bilirrubina aumentaba después de la hepatectomía en perros, la reacción de van den Bergh cambia de indirecta a directa y el pigmento biliar comenzaba a eliminarse por la orina; ello indicaba que el hígado no era el único órgano capaz de formar bilirrubina o convertirla a bilirrubina directa. Schoenfield y col. (112) observaron, por partición cromatográfica en fase reversible, que en perros hepatectomizados, la bilirrubina directa estaba constituida exclusivamente por pigmento I lo que indicaba su origen extrahepático; pero además dicho pigmento pasaba a bilirrubina diglucuronizada al ser perfundido a hígado aislado de la rata. Este bonito experimento demostraba dos cosas: que la bilirrubina monoglucuronizada podía ser de origen extrahepático, y que la forma diglucuronizada era de origen exclusivamente hepático (63, 112). No sabemos si esta diglucuronización hepática se realiza directamente o conjugando primero un radical glucurónico y después el otro.

La monoglucuronización extrahepática se realiza fundamentalmente por el riñón (112), pero, como acabamos de decir, no es exclusiva de él.

La indudable glucuronización de la bilirrubina por el hígado, se demuestra por su elevada riqueza en glucuronyltransferase y ácido uridindifosfato glucurónico, por la ausencia de formación de bilirrubina diglucuronizada en animales hepatectomizados (112), por el paso de bilirrubina monoglucuronizada a diglucuronizada en perfundidos de hígado aislado de rata y por la alta concentración de esta última en la bilis (el 75% es bilirrubina diglucuronizada y el 25% monoglucuronizada, 63).

En relación a su distribución (63), el pigmento I predomina en el

plasma de sujetos normales y en hepatopatías crónicas severas. El pigmento II es el dominante en la bilis de individuos normales, pero su concentración desciende en el daño hepatocelular. En la ictericia obstructiva predomina el pigmento II en plasma; pero si se prolonga, menoscabando la función hepática, prepondera el pigmento I.

Se ha observado que, incluso en sujetos normales, existe una pequeña cantidad de bilirrubina directa en plasma, en general inferior a 0,20mgr% (27). No se conoce bien si se trata de pigmento I ó pigmento II, ya que las técnicas actuales de determinación no suelen ser sensibles para tan bajas concentraciones. De cualquier modo, no es fácil explicar dicha presencia de bilirrubina directa en la sangre: podría tratarse o de bilirrubina conjugada regurgitada por el hígado o de monoglucuronizados formados extrahepáticamente, como hemos indicado, que serían lentamente eliminados. En opinión de Billing, sería un artefacto en la determinación.

Por la misma razón es árduo explicar la presencia de bilirrubina no conjugada o solo monoglucuronizada en la bilis. Podría tratarse de monoglucuronizados extrahepáticos eliminados por el hígado sin la ulterior diglucuronización. Otros autores (84) opinan la posibilidad de una deconjugación hepática de la bilirrubina después de su conjugación por el órgano, ya que el hígado es rico en beta-glucuronidasa; dado que, para su excreción por el hígado, la bilirrubina debe ser diglucuronizada, la presencia de monoglucuronizada o de no conjugada en la bilis solo puede ser explicada por una ulterior deconjugación, probablemente por la beta-glucuronidasa. Ha sido postulado (5) el estar implicados los lisosomas en la hidrólisis de la bilirrubina glucuronizada, por medio de la beta-glucuronidasa, particularmente en la ictericia obstructiva, dando lugar a bilirrubina no conjugada.

Se ha hablado de una capacidad máxima de conjugación por el hígado. Arias y Johnson, así como otros autores (113), exponen que el factor limitante de la conjugación de la bilirrubina por el animal normal no consiste en la falta de capacidad para conjugarse solamente, sino que probablemente afecte también a la captación de bilirrubina y a su excreción. En general se acepta que la capacidad hepática para conjugarse bilirrubina es mucho mayor que la requerida en condiciones normales y es una de las últimas fun-

ciones que pierde el hepatocito.

Existen una serie de sustancias (21,26,39,40,47,119) que actúan sobre el sistema glucuroniltransferasa, estimulando o inhibiendo, provocando alteraciones en la capacidad de conjugación de la bilirrubina; otras veces, la alteración radica no solamente sobre la conjugación, sino también en la captación o excreción. De todas esas sustancias, quizá la mejor conocida en este sentido sea el fenobarbital. La administración de este preparado a madres, una o dos semanas antes del parto, reducía sensiblemente la aparición de la ictericia (47) o disminuía intensamente los niveles altos de bilirrubina; la administración solo al recién nacido conseguía mucho menor efecto y la administración combinada era la que mejores resultados proporcionaba. Crigler, Norman y Gold (39), a niños con hiperbilirrubinemia no conjugada, no hemolítica, congénita, con severo kernicterus, administraron, además de fenobarbital oral, triyodotironina oral, S.T.H. intramuscular y propionato de testosterona intramuscular: solo el fenobarbital logró disminuir los niveles de bilirrubina sérica. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores para el fenobarbital (21) y la glutatimida (26), en éste último caso en ratas de Sprague-Dawley, siendo el efecto dosis-dependiente, pudiendo ser puesto en evidencia en tan poco tiempo como cuatro días.

El efecto del fenobarbital, así como de la glutatimida, en la reducción de la hiperbilirrubinemia no conjugada, es clásicamente atribuido al aumento de la actividad glucuroniltransferasa que provocan en el hepatocito, por estimulación del retículo-endoplásmico. En favor de esto tenemos el aumento de la concentración de proteínas citoplásmicas Y y Z que tiene lugar, como ya dijimos a nivel del retículo-endoplásmico, así como la ineficacia del fenobarbital en ratas Gunn homocigóticas (26), genéticamente carentes de actividad glucuroniltransferasa. Pero el hecho encontrado por otros autores (119) de reducción de hiperbilirrubinemia conjugada en casos de colestasis intrahepática crónica, hizo dudar sobre aquél posible mecanismo; estos últimos autores argumentaban dos hipótesis: estimulación de la excreción hepática de bilirrubina ya conjugada y estimulación de la excreción renal de bilirrubina conjugada, lo mismo que se había visto que el fenobarbital aumentaba el aclaramiento renal de sulfadimetoxina. Davies y col. (40) admitieron un aumento de la actividad del complejo citocromo-P450, como

respuesta a la administración de ciertas drogas, para su eliminación; tal vez por un mecanismo similar podría explicarse el efecto beneficioso, sobre la conjugación, de ciertas drogas y quizá del fenobarbital.

Por el contrario, otras sustancias inhiben la actividad glucuroniltransferasa (21), compitiendo en la conjugación con la bilirrubina, tal y como ocurre con la novobiocina y diversas drogas, así como sustancias con actividad biológica (corticoides, estrógenos, tiroxina, adrenalina, etc.), pudiendo deparar situaciones de ictericia (21,24,26,39,40,47,53,119).

No toda la bilirrubina es conjugada a glucurónido. Existe una parte, del 10-15%, que es conjugada con otros radicales, fundamentalmente sulfatos (50%), por acción de una sulfatotransferasa, según trabajos aportados por Isselbacher y Mc Carthy (67), así como los de Schoenfield y Bollman (111). Según estudios de los primeros, con sulfato radiactivo, el sulfato de la bilirrubina apareció en la bilis de ratas, gatos y hombre. En oposición al glucurónido de bilirrubina, que está unido a los grupos carboxílicos, el sulfato está unido a los grupos hidroxílicos, es álcali-estable y resiste la hidrólisis de la beta-glucuronidasa. En los trabajos de Schoenfield y Bollman, la bilirrubina conjugada con sulfato no se encontró asociada al pigmento I, pero fue encontrada con el conjugado glucurónico del pigmento II; la incubación con beta-glucuronidasa permitió la separación del glucurónido del sulfato cuando se hizo la cromatografía en papel; cuando el hígado era injuriado ( $Cl_4C$ , etc.) la proporción del sulfato aumentaba y la de glucurónido disminuía. Esto último tiene gran interés en procesos en que la función hepática esté perjudicada, ya que, teóricamente, puede suplir, vicariantemente, la conjugación glucurónida. Los citados autores no pudieron detectar la sulfato-conjugación en otros órganos distintos del hígado.

No obstante, esta conjugación de la bilirrubina con radicales sulfato no es aceptada por todos y hasta su importancia funcional ha sido seriamente cuestionada, ya que en desórdenes caracterizados por deficiencia de glucuroniltransferasa no se ha advertido un incremento compensador en la formación de conjugados no glucurónicos de bilirrubina (20,53,111). Estudios posteriores serán necesarios para dilucidar esta cuestión.

Es también admitida por otros autores la conjugación con glicina, gru-

pos metflicos, etc. existiendo pocos trabajos al respecto.

Hoy día, incluso la conjugación glucurónida empieza a originar seria problemática. En una editorial relativamente reciente, publicado por Billing y Jansen (22) comentan estos autores que parece ahora que la conjugación de la bilirrubina es un proceso complejo que comprende a una variedad de mono y disacéridos. Aunque la mayoría de los investigadores consideran que la conjugación glucurónida es la más importante, recientes estudios han sugerido que en el hombre la conjugación glicosídica con ácidos disacáridos puede ser significativa. Estos ácidos disacáridos serían el ácido aldobiurónico, ácido pseudoaldobiurónico y ácido hexaronsilhexurónico. 1970 ha dado "un nuevo enfoque" al problema de la conjugación de la bilirrubina, en el que la heterogeneidad de los pigmentos biliares ha sido firmemente establecida, estando en tela de juicio la existencia de una sola bilirrubina conjugada, la glucurónida. Heizwegh y col. han desarrollado un sistema cromatográfico en capa fina con un alto poder resolutivo, con el cual separan rápidamente los azopigmentos en cuatro grandes grupos: alfa, beta, gamma y delta. Los tres últimos grupos son álcali-lábiles, contienen un radical ácido hexurónico (así considerado por la reacción nafto-resorcinol) y forman derivados metilados característicos con el diazometano. El pigmento delta, que es el principal azopigmento derivado de la bilis humana y de rata, es hidrolizado por la beta-glucuronidasa, lo que nos indica que se trata de un conjugado glucurónido. El pigmento beta no está presente en la bilis humana normal, pero incrementa, junto con el gamma, en la ictericia obstructiva. El beta y gamma no son atacados por la beta-glucuronidasa. Lo que habla en favor de una estructura no glucurónida. Dentro del grupo beta, se llegó a separar, por Kuenzle, ocho subgrupos diferentes: el B<sub>4</sub> era una mezcla de tres aldobiurónidos, el B<sub>5</sub> un hexaronsilhexurónido y el B<sub>6</sub> un pseudoaldobiurónido. Ni Heizwegh ni Kuenzle consiguieron separar conjugados sulfatados.

Por todo lo expuesto vemos que la conjugación de la bilirrubina no es tan esquemática como la habíamos considerado hasta ahora; su complejidad requiere nuevas investigaciones para una mejor comprensión de este enigma de tan vital importancia. La misma formación glucurónida extrahep-



tica, admitida por muchos autores, como ya expusimos, obtenida de homogenizados de riñón e intestino, o de perfundidos de estos órganos, que dan la reacción directa *in vitro*, no se ha demostrado que sea bilirrubina glucuronizada ni que tengan dependencia de glucuroniltransferasa (53).

En relación a la enzima que participa en la conjugación glucurónica, como dice Arias (5,53), existe gran incertidumbre sobre la existencia de diferentes glucuroniltransferasas o, por el contrario, de una sola enzima con variable afinidad para diferentes receptores. El amplio espectro de substratos, en diversidad de grados de desarrollo con diferentes substratos en diversas especies, capacidad de rata Gunn y del gato para formar glucurónidos con algunos substratos y no con otros, diferencias en la distribución submicrosomal, respuestas a la hipofisectomía y terapia de substitución, respuesta a la dietilnitrosamina, etc. han hecho suponer a algunos investigadores que allí puedan existir múltiples formas de la enzima, las cuales varían de unas especies a otras. Por otro lado, la opinión de que una sola glucuroniltransferasa catalice la formación de acil y fenol-glucurónidos es sugerida por la observación de que ratas y sujetos humanos con ictericia crónica y deficiencia de glucuroniltransferasa, tienen defectiva formación de ambas formas de glucurónidos.

La bilirrubina en los tejidos puede ser puesta de manifiesto por diversos métodos. La mayoría de ellos implican una oxidación de los pigmentos con producción de componentes coloreados, tales como la biliverdina. Solamente la bilirrubina conjugada parece teñirse por tales técnicas, habiendo sido aportados resultados negativos con tejido cerebral de niños con kernicterus, por estar impregnados dichos tejidos solo de bilirrubina no conjugada. La diazorreacción también ha sido utilizada, pero el demostrar diferentes tipos de bilirrubina en los tejidos no ha tenido éxito. Raia (96) describió así la aplicación de la reacción de van den Bergh a nivel histológico, con el que es posible demostrar, en hígado y riñón humanos de pacientes con cirrosis e ictericia obstructiva, la presencia de un pigmento amarillo, principalmente localizado en el canalículo biliar, que daba la reacción directa en la solución acuosa de dicloranilina; esta reacción no la daban los pigmentos presentes en el hígado de ratas Gunn, por ser todos

ellos de tipo no conjugado. Si entonces añadimos reactivo diazoico "acelerador" se consigue extensa tinción de células hepáticas, células de Küpffer y del contenido del canalículo biliar, tiñéndose tanto la bilirrubina conjugada como la no conjugada. Se está estudiando la aplicación de este método rápido a biopsias hepáticas.

Como hemos visto, la conjugación hepática convierte a la bilirrubina liposoluble, de reacción indirecta, en hidrosoluble, de reacción directa, mediante su copulación con el ácido glucurónico. Explicaremos someramente esta dualidad de reacción.

La bilirrubina que ha sido conjugada por el hepatocito y que llamaremos "directa", reacciona "directamente" con el reactivo diazoico de Erlich, en la prueba de van den Bergh, dando un color azul-violeta (casi morado). En cambio, la bilirrubina que todavía no ha sido conjugada por el hígado, a la que llamamos "indirecta", no reacciona directamente con el reactivo diazoico, sino que es preciso tratarla previamente con alguna sustancia, como el alcohol, dando entonces positiva la reacción de van den Bergh. Clásicamente se había atribuido este diferente comportamiento a que la bilirrubina indirecta permanecía unida a la globina, precisando el tratamiento previo con alcohol para desnaturalizar y separar dicha proteína. Sin embargo, como ya indicamos al hablar de la bilirrubina circulante en el plasma, sabemos hoy que, por debajo de un PH de 5, toda la bilirrubina, directa e indirecta, está separada de la albúmina o de cualquier otra proteína (59,70). Como quiera que la reacción de van den Bergh tiene lugar a PH4, ello indica que, en el momento de la reacción, ambas bilirrubinas están dissociadas de la proteína transportadora. Por tanto, la causa del distinto comportamiento no puede residir en la unión proteica de la bilirrubina indirecta. Hoy se admite que la diferencia radica en la distinta solubilidad de una y otra bilirrubina, siendo insoluble en medio acuoso la bilirrubina indirecta, requiriendo el tratamiento previo con alcohol para su solubilización antes de reaccionar con el reactivo diazoico.

Además de la bilirrubina, otras sustancias son conjugadas con el ácido glucurónico para su eliminación del organismo: diversas drogas, hormonas (corticoides, estrógenos, tiroxina, adrenalina), agentes colecisto-

gráficos, etc. Dichas sustancias pueden competir con la bilirrubina en la conjugación (otras veces, en la captación o excreción) originando situaciones clínicas que cursan con hiperbilirrubinemia de indirecta y que es preciso conocer para su diagnóstico y terapia.

Para terminar este apartado sobre la conjugación hepática, comentaremos someramente algunos síndromes clínicos que cursan con ictericia por déficit de la enzima glucuroniltransferasa o por presencia en el plasma de inhibidores de la misma:

A) Por déficit o ausencia de glucuroniltransferasa. La situación más grave viene representada por el síndrome de Crigler-Najjar (3,68,94,101,107 108) caracterizado por severa hiperbilirrubinemia no conjugada, debida a falta definitiva de glucuroniltransferasa. Algunos autores (3) describen dos tipos dentro del síndrome, que son fenotípicamente homogéneos pero genotípicamente heterogéneos: a) grupo I: Habitualmente presentan hiperbilirrubinemia más severa y kernícterus más frecuente. La bilis no está coloreada y contiene trazos de bilirrubina no conjugada solamente. El defecto de conjugación es transmitido con carácter recesivo autosómico y la hiperbilirrubinemia no se afecta por la administración de fenobarbital. b) grupo II: Hiperbilirrubinemia menos severa, sin kernícterus. La bilis está pigmentada y contiene bilirrubina glucuronizada. Es transmitida la enfermedad con carácter autosómico dominante y responde dramáticamente a la administración de fenobarbital.

Ciertos animales, como una variante de ratas Vistar (Gumm), presentan también ausencia de glucuroniltransferasa, pudiendo desarrollar kernícterus (68) similar al que observamos en el hombre, cumpliendo sus mismos criterios: evidencia de anormalidad del sistema nervioso central, tinción amarillenta de los núcleos grises, persistencia de la tinción cuando el tejido es fijado en formelina, presencia del pigmento dentro de las células ganglionares, evidencia de degeneración de las células nerviosas en secciones examinadas microscópicamente. Estos mismos autores (68) observaron una "paradójica" caída de la bilirrubina sérica, con intensificación de los signos neurológicos y de la tinción nuclear al tratar a los animales con sulfonamidas (por unión competitiva de éstas con la albúmina y consiguiente migración de la bilirubi-

na a los tejidos).

Sin embargo, Schmid y Hammaker (108), utilizando bilirrubina- $C^{14}$ , estudiaron el metabolismo de la bilirrubina en pacientes con síndrome de Crigler-Najjar y en ratas Gunn, llegando a la conclusión de que, cuando la glucuronoconjugación está ausente, la eliminación de bilirrubina del organismo intenta compensarse con otros caminos metabólicos diferentes: degradación del pigmento a derivados más polares, diazonegativos; transferencia del pigmento, a través de la mucosa intestinal, dentro de la luz del intestino; excreción de bilirrubina no conjugada en la bilis, etc. Cuando la proporción funcional combinada de estos caminos metabólicos equivale a la formación del pigmento, aparece una situación de equilibrio estable, permaneciendo constantes los niveles de bilirrubina sérica.

Estas situaciones clínicas de ausencia de glucuroniltransferasa no parece tener actualmente tratamiento eficaz. Rugstad y col. (101) realizaron trasplante de células de una cepa clonal ( $MH_1C_1$ ) de hepatoma de rata, subcutáneamente, a ratas Gunn homocigóticas (carentes totalmente de glucuroniltransferasa); gracias a la actividad enzimática presente en las células transplantadas, las ratas receptoras desarrollaron la capacidad de conjugar bilirrubina y eliminarla del organismo, normalizándose casi completamente la ictericia. El interés de este experimento exige futuras investigaciones en cuanto a su posible aplicación a la clínica humana.

Existe también déficit de glucuroniltransferasa, pero aquí con buen pronóstico, en ciertas ictericias del recién nacido no hemolíticas, especialmente en prematuros, por inmadurez de los sistemas enzimáticos de la conjugación, que desaparecen con el desarrollo del niño (42). Sin embargo, a la luz de los acontecimientos actuales, no parece claro que la ictericia neonatorum no hemolítica se deba a déficit de glucuroniltransferasa y sí a alterada captación hepática (53), por diversas razones: a) El desarrollo del sistema glucuroniltransferasa varía grandemente en diferentes especies, la mayoría de las cuales no padecen ictericia fisiológica. b) Di Toro y col. estudiaron la actividad glucuroniltransferasa en biopsias hepáticas de recién nacidos normales, utilizando un ensayo fluorimétrico. De resultados de ello no encontraron déficit de glucuroniltransferasa en el período neonatal inmediato

c) En monos recién nacidos y en humanos se observó una captación hepática disminuida de varios aniones orgánicos, incluyendo la bromo. En monos Rhesus la amduración de la captación hepática de la bromo coincide con el desarrollo de la proteína Y. Grodsky y col. describieron relativa deficiencia de proteínas aceptoras citoplásmicas en el desarrollo del hígado de rata. Por todo ello se piensa que en el hombre, la ictericia fisiológica neonatal puede ser de origen multifactorial, implicando a la captación y conjugación hepáticas.

Aunqus, clásicamente, el síndrome de Gilbert ha sido considerado como un estado hiperbilirrubinémico de indirecta, no hemolítico, benigno, de grado moderado o subclínico, sin alteración estructural hepática, por déficit de captación (63,93,106), estudios posteriores parecen demostrar la presencia también de un déficit de conjugación (23,25,53); para otros autores la patogenia es incierta (94) y algunos dan un nuevo enfoque al problema(17) haciendo ver que la causa reside en un deficiente aclaramiento hepático de la bilirrubina plasmática, en presencia o no de un componente hemolítico más o menos moderado: estos últimos autores, realizando estudios con radiobilina no conjugada, concluyeron en que el déficit de aclaramiento hepático de bilirrubina se debía a un defecto combinado de captación y conjugación hepáticas.

B) Por presencia de inhibidores de la glucuroniltransferasa.-Aquí no hay déficit de glucuroniltransferasa, pero la conjugación no se realiza por inhibición de aquella enzima por determinadas sustancias. La hiperbilirrubinemia neonatal familiar transitoria (síndrome de Lucey-Driscoll) es un desorden familiar (42,53) caracterizados por mujeres, aparentemente sanas, que regularmente dan a luz niños con severa hiperilirrubinemia no cojugada, no hemolítica, y aun alto riesgo de kernicterus; durante el último trimestre del embarazo, el suero de estas madres contiene un factor no identificado, probablemente esteroideo, el cual inhibe la actividad glucuroniltransferasa in vitro, desapareciendo rápidamente después del parto del suero de la madre y del niño.

Otro raro desorden hereditario, asociado con inhibición de la actividad

glucuroniltransferasa, es la ictericia neonatal prolongada en niños con alimentación materna, que excretan, con la leche, un pregnano 3 alfa-2 beta-di-ol, que inhibe a la enzima; la ictericia desaparece al suprimir la lactancia materna y no se presenta por alimentación con leche humana normal. Estas madres excretan por la orina el isómero pregnanodiol.

Hay otras situaciones clínicas de hiperbilirrubinemia no conjugada, no hemolítica, cuya patogenia es incierta y algunos autores suponen factores de inhibición de la glucuroniltransferasa o de otra índole. Así, el ayuno aumenta la bilirrubina no conjugada. En el mismo síndrome de Gilbert, la concentración de bilirrubina sérica puede duplicarse tras un breve ayuno, retornando a niveles anteriores después de más de seis horas de la ingesta. Se desconoce su patogenia, pero puede relacionarse con la formación hepática del pigmento biliar o competición de ciertas sustancias, liberadas en el ayuno, a la transferencia de la bilirrubina al interior del hepatocito.

El ejercicio, la infección, la sepsis, ingestión de alcohol, menstruación, embarazo, contraceptivos orales o estógenos, etc. pueden deparar estados hiperbilirrubinémicos de indirecta, cuya etiopatogenia no se conoce bien, pudiendo depender de un defecto de captación o de conjugación. Así ocurre también con la novobiocina, rifampicina y morfina, que pueden competir con la bilirrubina en la conjugación (21,40).

El tratamiento de estos estados hiperbilirrubinémicos de indirecta puede realizarse por diversos medios. Los corticoides no solo son útiles en los casos de aumento de bilirrubina no conjugada por hiperhemolisis, sino que facilitan la captación hepática y tal vez la conjugación. Las sulfonamidas y salicilatos descienden los niveles séricos de bilirrubina, por unión competitiva con la albúmina, pero no debe ser utilizados por el peligro de desplazamiento del pigmento desde el suero a los tejidos, pudiendo precipitar un kernicterus aún a relativamente bajas concentraciones de bilirrubina indirecta. Diversas drogas, como el fenobarbital, D.D.T., etc. reducen la bilirrubina sérica no conjugada por estimulación de la actividad glucuroniltransferasa a nivel de la fracción microsomal del hepatocito, con proliferación del retículo-endoplásmico liso. El D.D.T. parece que estimula el citocromo P-450 y una sola dosis bastó para reducir la bilirrubina sérica durante 30 días en un

paciente con tipo II de síndrome de Crigler-Najjar (53). Se ha observado que la cloroquina aumenta la actividad glucuroniltransferasa en hígados de rata recién nacidas cuando la droga se administraba a la madre, pero este efecto no se observó en la ictericia fisiológica del recién nacido humano cuando la cloroquina se administraba a la madre durante el último trimestre del embarazo.

La exposición a la luz azul o a la luz ultravioleta reduce los niveles séricos de bilirrubina no conjugada, la cual es descompuesta en pigmentos derivados menos coloreados y más polares, excretados por la bilis y la orina y con menor neurotoxicidad. Esta propiedad se utiliza para tratar estados hiperbilirrubinémicos de indirecta para prevenir el kernicterus, exponiendo a los enfermos a la luz solar o a la luz azul artificial (53).

Dado el papel que juega el círculo enterohepático de la bilirrubina en el entretenimiento de la ictericia, se ha tratado a niños recién nacidos con una dieta suplementada con agar (90) durante los primeros cinco días de la vida, comenzando a las veinte horas del nacimiento. El agar absorbe y estabiliza la bilirrubina en solución acuosa, previniendo su reabsorción intestinal y su transformación bacteriana en el intestino. Se observó ausencia de ictericia del recién nacido y elevada excreción de bilirrubina en las heces. Otros autores (46) han comprobado el mismo efecto. La colestiramina presenta propiedades similares, por unión no específica con la bilirrubina en el intestino, observado en ratas Gunn, donde se reduce la ictericia (53); pero este efecto no ha sido observado en el hombre.

TRANSPORTE INTRAHEPATOCITARIO DE LA BILIRRUBINA CONJUGADA.-

Una vez conjugada la bilirrubina con el ácido glucurónico ha de ser transportada hasta el polo biliar del hepatocito para su excreción en el canalículo biliar. Dicho transporte no es tampoco bien conocido, pero como ocurría para la bilirrubina conjugada intrahepatocitaria, se supone que tiene lugar por medio de las proteínas citoplásmicas Y y Z, o por un pool pequeño de albúmina citoplásmica con rápido intercambio, ya que estudios sobre la distribución subcelular de la bilirrubina tritiada (30) demuestran que no hay diferencias en la misma durante las fases de captación o excreción, de tal forma que dicha distribución es una función constante de la concentración de bilirrubina intracelular. Esta fase del transporte, como las anteriores, está controlada por la tasa de secreción en la bilis (24); todo proceso que perturbe la excreción hepática de bilirrubina repercute inmediatamente en el transporte desde el lugar de conjugación al polo biliar del hepatocito.



#### EXCRECION HEPATICA DE LA BILIRRUBINA.-

Lo mismo que acontece con la captación, transporte y conjugación, la excreción de bilirrubina por el hígado presenta todavía muchos problemas por resolver. Numerosos trabajos han sido publicados al respecto (5,6,16, 19,24,30,33,72,97,113,114,125,129,133), siendo de mayor interés aquéllos que emplean los aclaramientos plasmáticos de B.S.P. o de bilirrubina marcada con  $C^{14}$  o  $H^3$ .

El primer concepto que debemos adquirir de la excreción hepática de bilirrubina es el de que se trata de un proceso activo y no de una simple difusión desde el hepatocito al canalículo biliar (53). Aunque su concentración nunca ha sido medida directamente en los canalículos biliares, se presume que la alta concentración observada, en relación a la concentración de bilirrubina plasmática, resulta de procesos excretorios dependientes de la energía de la célula hepática y no de reabsorción soluble selectiva del epitelio. Este proceso excretorio se postula que implica un sistema de transporte activo, aunque la fuente de energía y el mecanismo de acoplamiento de ésta se desconocen (5,53). Lisosomas, membranas del aparato de Golgi y microsomas han sido supuestamente imbricados en este proceso, pero estudios con bilirrubina tritiada (30) no han demostrado acumulación de la misma en las fracciones mitocondriales ni nucleares y es dudosa su presencia en aquéllas otras organelas.

Los canalículos biliares, anatómicamente adecuados como lugar para la excreción, ya que su gran área de superficie está intensamente incrementada por la presencia de microvilli (5,53), además de la riqueza en fosfatasa, las cuales son importantes en el transporte de iones en otras células.

Un segundo concepto importante que debemos tener presente es el de que

la conjugación es virtualmente esencial para la excreción de bilirrubina en condiciones normales. Dicha excreción de bilirrubina conjugada parece tener una tasa limitada. En el desarrollo de cerdos de Guinea y en los monos, la capacidad de excretar bilirrubina aumenta con la edad durante el periodo neonatal y parece estar en proporción limitada en todas las edades. En ratas adultas, la capacidad excretora máxima es aproximadamente de 60  $\mu$ gr de bilirrubina excretada /por 100 gr rata/por minuto; la rata normalmente excreta 1-2  $\mu$ g de bilirrubina. Cifras semejantes no han sido calculadas en el hombre, pero la observación clínica sugiere una gran reserva funcional para la excreción hepática. Estas observaciones explican probablemente porque la hemolisis, aún cuantiosa, ocurrida en pacientes con normofuncionalidad hepática se traduce en moderada hiperbilirrubinemia no conjugada, mientras que cuando la función hepática está menoscabada y hay hiperbilirrubinemia conjugada y bilirrubinuria, pudiendo clínicamente simular una ictericia b obstructiva.

La excreción de bilirrubina no solo está determinada por una capacidad máxima de la misma (transporte máximo o  $T_m$ ), como acabamos de decir, sino por la existencia de una capacidad de almacenaje relativo ( $S=Storage$ ) del pigmento dentro del hepatocito (114), siendo posible medir ambos parámetros mediante el test de tolerancia de la B.S.P.

Otros aniones, exógenos y endógenos, son concentrados por el hepatocito de una forma similar a la bilirrubina (24,53,114); algunos son conjugados previamente a la excreción, pero otros, como el verde indocianina, no son metabólicamente alterados. Determinados medios de contraste colescistográficos se ha demostrado que compiten con la bilirrubina en la excreción, pudiendo deparar ictericia. El bunamiodil (orabilix), ácido yodopanoico (Telepaque) y la yodipamida (Colegrafin), todos ellos agentes colecistográficos, ha sido demostrado por Billing y col. (24) que interfieren con la excreción de bilirrubina competitiva. Se pensó que este efecto pudiera ser debido a una alteración en la captación, pero se vió, administrando conjuntamente aquéllos con bilirrubina no conjugada, que los hepatocitos estaban más cargados de pigmento que el hígado de los animales control que solo recibieron bilirrubina pero no bunamiodil. Entonces pudiera interpretarse con un defecto de conjugación, posibilidad que

fué descartada repitiendo el experimento con bilirrubina conjugada, volviéndose a observar el depósito del pigmento intrahepatocitario en los animales que a la vez recibían bunamiodil.

Otras drogas y esteroides, ya descritos son también excretados por este mismo mecanismo, pudiendo, por ello, deparar situaciones clínicas de hiperbilirrubinemia de directa, al competir con la excreción de bilirrubina. Se ha supuesto que este mecanismo excretorio común de aniones orgánicos por el hígado, es similar al encontrado en el riñón, el cual es dependiente de la excreción activa de sales biliares, los principales aniones orgánicos de la bilis de los mamíferos. Se ha demostrado multitud de caminos excretorios en el hombre y en la oveja portadoras de enfermedad de Dubin-Johnson, un defecto hereditario de la función excretora hepática.

Recientes estudios con microscopía electrónica y citoquímica han sugerido que la bilirrubina puede estar asociada a densos corpúsculos pericanaliculares durante la fase excretora. Estas partículas se cree por algunos que son similares a los lisosomas, ricos en hidrosilasa ácida, los cuales pueden jugar un papel importante en la excreción de bilirrubina (30). Al parecer, dichos lisosomas están implicados en la hidrólisis glucuronizada, por medio de la beta-glucuronidasa, especialmente en la ictericia obstructiva, dando lugar a bilirrubina no conjugada, que es retornada al plasma (5).

En la clínica se dan situaciones de hiperbilirrubinemia de directa por alteraciones de la excreción de bilirrubina conjugada. Esto puede ser debido a una obstrucción del tracto biliar (litiasis, carcinoma, etc.), a un fallo de la secreción biliar (colestasis) y a una perturbación de la excreción propiamente dicha. Esta última situación se da, principalmente, en dos circunstancias clínicas: el síndrome de Dubin-Johnson y el síndrome de Rotor.

El síndrome de Dubin-Johnson (2,42,72,114,131,133), descrito casi simultáneamente por Sprinz y Nelson, consiste en un defecto de la excreción hepática de la bilirrubina, caracterizado por su incidencia familiar e ictericia crónica intermitente o continua, con presencia en el plasma de hiperbilirrubinemia predominantemente conjugada, en general al grado moderado, sin alteración estructural hepática, pero con la presencia, dentro del hepatocito, de un pig-

mento pardo oscuro, cuya naturaleza no es bien conocida (lipofuschinas, melamina), amorfo y que presta al hígado su característico color negro. Nunca se encuentran depósitos de bilirrubina ni de hierro, así como tampoco trombos biliares. La colecistografía oral es habitualmente negativa, no lográndose visualizar la vesícula; a veces se consigue con doble dosis. La curva de la bromo, como veremos más adelante, tiene un característico "reascenso", después del descenso habitual rápido.

En el síndrome de Rotor, de gran analogía con el anterior, está ausente el pigmento pardo oscuro dentro del hepatocito y la colecistografía oral suele ser positiva. La curva de la bromo ofrece un comportamiento similar al anterior.

El síndrome de Dubin-Johnson (ictericia idiopática crónica) se ha descrito también en ovejas (5,53).

Otros factores pueden deparar estados de hiperbilirrubinemia conjugada. También aquí la sepsis, ejercicio, alcohol, incrementan la concentración de bilirrubina sérica conjugada, desconociéndose su mecanismo. Los contraceptivos orales, especialmente los que contienen estrógenos, provocan también aumentos de bilirrubina directa, probablemente por competir con los mecanismos excretores hepáticos; similares hallazgos han sido aportados durante el último trimestre del embarazo. Parece ser que los contraceptivos orales disminuyen selectivamente el transporte máximo de bilirrubina, mientras conservan su capacidad de almacenaje de hepático de la bromo normal. En las ratas, el etinl-estradiol, el mayor componente estrogénico de los contraceptivos orales, produce colestasis intrahepática por cambio de permeabilidad en la bilis canalicular.

Finalmente, en procesos inflamatorios del hígado (hepatitis agudas o crónicas) etc. puede tener lugar un déficit de excreción del pigmento biliar, dando lugar a estados hiperbilirrubinémicos de directa (hepatitis colestásica).

---

Como dijimos al hablar de la captación hepática de bilirrubina, existen procedimientos analíticos para detectar un defecto de aquella o de la excreción, de gran interés en la clínica y también para una mejor comprensión del metabolismo del pigmento. Estos procedimientos son fundamentalmente dos:

a) Estudios con bilirrubina marcada con  $C^{14}$  o  $H^3$ . b) Estudios de curvas de aclaramiento plasmático de la bromo.

El empleo de la bilirrubina como test de la excreción, fué introducido por Eilbott en 1927, pero un estudio de la curva de desaparición del pigmento del plasma más completo, fué realizado por With en 1943 (129). Este autor inyectaba la bilirrubina intravenosamente y determinaba su concentración plasmática de 2-5 minutos después de la inyección y 3-4 horas más tarde. Las curvas resultante no mostraron variaciones características, no encontrando significación alguna, en contra de autores previos. En cambio, Billing, Williams y Richards (19), modificando los tiempos de extracción (cada 5 minutos la primera hora, y cada media hora las 4 horas siguientes) obtuvieron valiosísimas conclusiones en una amplia casuística:

a) En el síndrome de Gilbert encontraron una disminución, con respecto a los normales, de la captación hepática de bilirrubina.

b) En los estados de hiperbilirrubinemia post-hepatitis, hallazgos similares a los del Gilbert.

c) En el Dubin-Johnson se observó un déficit de excreción de la bilirrubina inyectada, con un gradual ascenso de la curva después de un rápido descenso, similar a lo observado con la curva de aclaramiento de la bromo, como veremos después.

d) En el síndrome de Rotor, comportamiento idéntico al del grupo de Dubin-Johnson.

e) En las cirrosis, predominante defecto de la excreción.

f) En la ictericia hemolítica, respuesta variable, no valorable.

Otros autores posteriores (110), en el caso de la cirrosis hepática, realizando aclaramiento plasmático de bilirrubina- $C^{14}$ , encontraron déficit de captación y conjugación hepática, pero no defecto de excreción.

Weimbren y Billing (125) realizaron aclaramiento hepático máximo de bilirrubina en ratas normales y tras la hepatectomía parcial (hígado en regeneración), por infusión de bilirrubina intravenosa, calculando la cantidad de pigmento biliar excretado en la bilis. Durante las 24 horas siguientes a la hepatectomía parcial, la capacidad excretora no incrementó tan rápidamente en

proporción al peso del tejido hepático regenerado, pero pronto la capacidad excretora aumentó con el incremento del peso.

Berk y col. (17), utilizando radiobilina no conjugada, en once pacientes con hiperbilirrubinemia crónica de indirecta, sin alteración estructural hepática, observaron aumentada la retención del isótopo en el plasma a las 4 horas y una reducción en el aclaramiento hepático de bilirrubina, atribuyéndolo, mediante análisis multicomportamental, a un defecto de captación y de conjugación.

No obstante su utilidad, por sus inconvenientes y economía, lo más habitual es el empleo bromo-sulfoptaleína (B.S.P.), en lugar de la bilirrubina. Del estudio de las curvas de desaparición del pigmento del plasma, podemos obtener datos muy valiosos.

Antes de seguir adelante es preciso que consideremos al proceso captación-conjugación-excreción como ubicado en un sistema con tres compartimentos (fig.6 ): plasma, hígado y bilis, de tal forma que un pigmento (bilirrubina, bromo) puede pasar del plasma al hígado, "a", del hígado a la bilis, "h", o del hígado, sin realizar la conjugación, nuevamente al plasma, "b". A partir de los estudios de Richard, Tindall y Young (97) podemos calcular los datos "a", "b" y "h" si medimos rigurosamente los niveles plasmáticos B.S.P. en sangre tras una inyección intravenosa única. Al realizar las extracciones en cortos periodos de tiempo, obtenemos una curva, de forma característica, con un primer componente de descenso rápido, cuya pendiente llamamos  $K_1$  (fig.7 ), seguido de un segundo componente de descenso lento, siendo su pendiente  $K_2$ . A la intersección, con el eje Y, del sistema de coordenadas, de la tangente al primer componente de la curva, le llamamos A, y B intersección con el mismo eje Y de la tangente del segundo componente de la curva exponencial que hemos obtenido. Conocidos A, B,  $K_1$  y  $K_2$  podemos obtener, con las fórmulas indicadas en la fig.7 los valores "a" (=captación), "h" (=excreción), "b" (regurgitación al plasma).

Este mismo tipo de curva se obtiene cuando se emplean otros colorantes, como la misma bilirrubina (según hemos expuesto más atrás) o el Rosa de Benqala, aplicándose los mismos cálculos.

Diversos trabajos han sido realizados en este sentido (6,14,72,97,133),

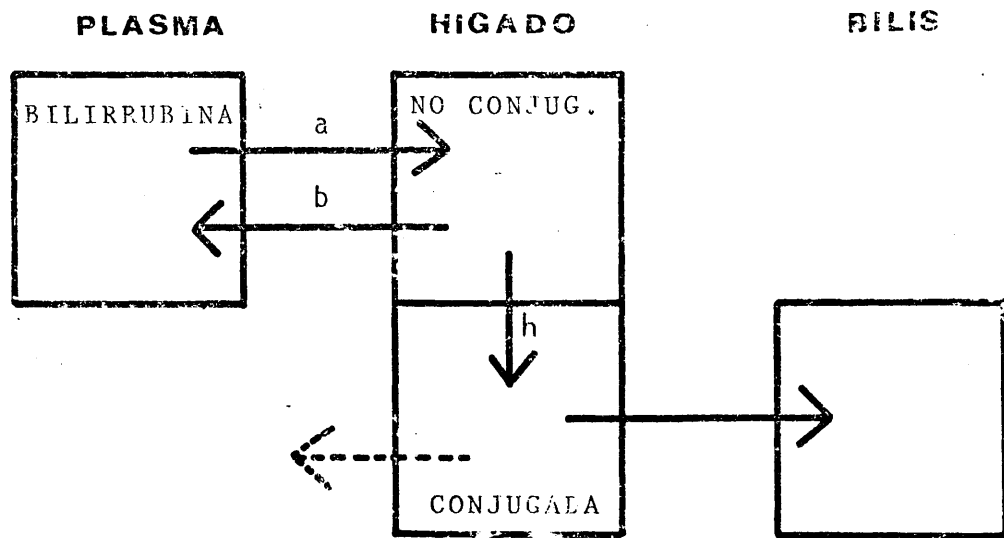


FIG. 6.- División compartamental esquemática de la captación, conjugación y excreción de la bilirrubina.

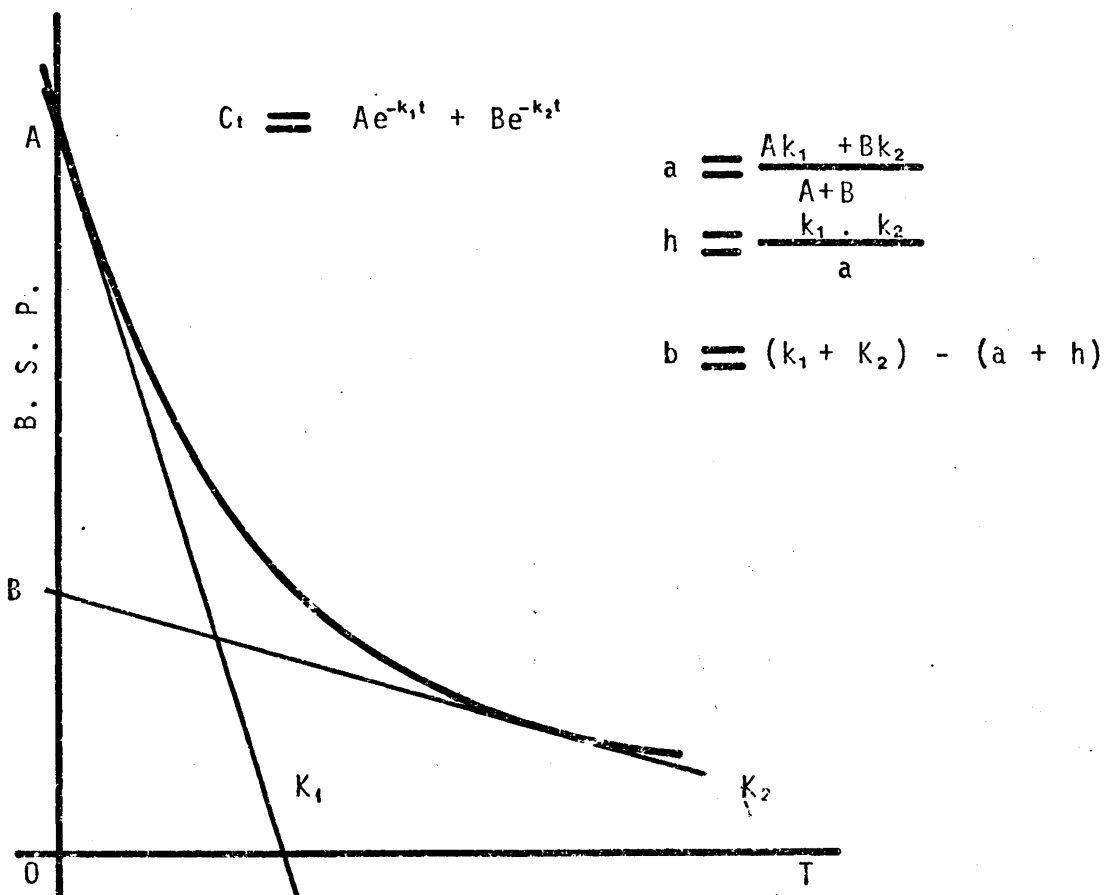
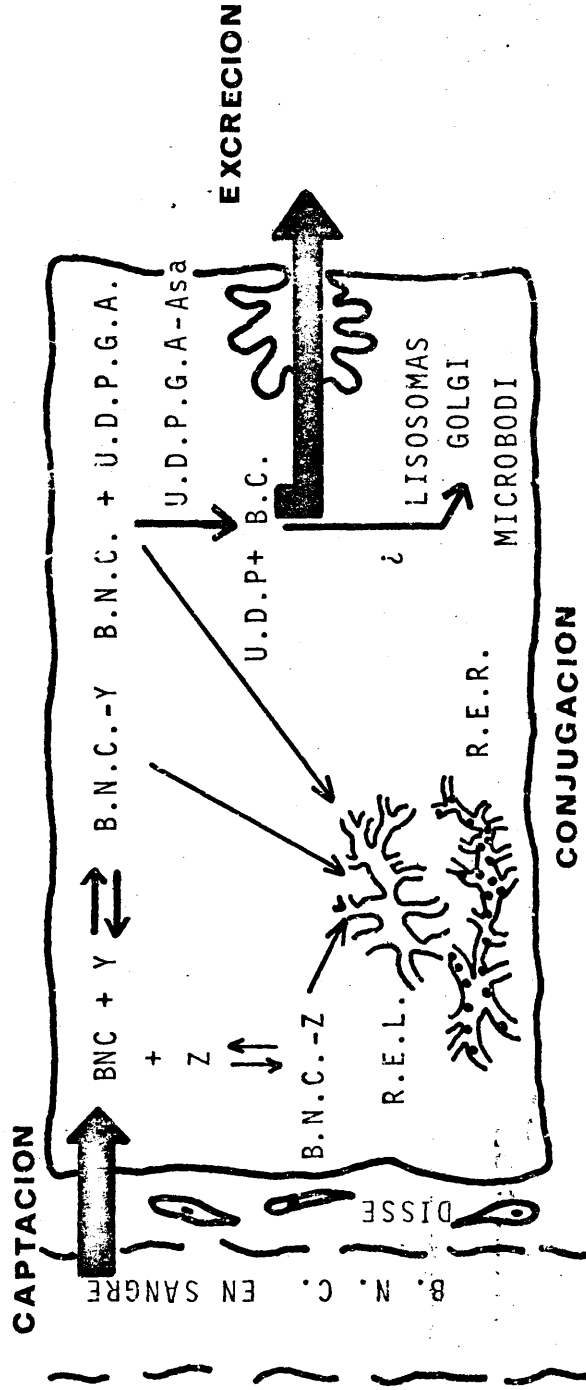


FIG. 7.- Curva exponencial de aclaramiento de la B.S.P.

B.N.C.	Bilirrubina no conjugada.	R.E.L.	Reticulo - endoplásmico liso
B. C.	Bilirrubina conjugada.	R.E.R.	Reticulo - endoplásmico rugoso
U.D.P.	Uridínifosfato	U.D.P.G.A.	Acido uridínifosfatoglucurónico
Y y Z	Proteínas Y y Z.	U.D.P.G.A. Asa:	Glucuroniltransferasa



POLO SINUSOIDAL      HEPATOCITO      POLO BILIAR

FIG. 8

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA CAPTACION, CONJUGACION Y EXCRECION DE LA BILIRRUBINA



obteniéndose resultados similares:

a) En el síndrome de Gilbert y en ciertas ictericias posthepáticas, con déficit de captación de bilirrubina. Había disminución de "a" y reducción de la pendiente  $K_1$ , debido a prolongada permanencia de la BSP en plasma por el déficit de captación de la misma por el hepatocito. La bilirrubina del plasma era predominantemente de la forma no conjugada, así como la B.S.P.

b) En el Dubin-Johnson y en el Rotor el valor de "a" permanece normal, así como la pendiente  $K_1$ . La tasa de regurgitación de B.S.P. libre a la sangre permanece normal (no hay déficit de conjugación). En cambio la "h" y  $K_2$  se hacen negativos, como expresión de retorno de B.S.P. conjugada a la sangre (reascenso del segundo componente de la curva), por no poderse excretar en la bilis.

Algunos autores (133) y Billing han aportado casos en que en el síndrome de Rotor se observa un déficit de captación ("a" disminuida) y ausencia de regurgitación a la sangre de B.S.P. conjugada.

Cuando encontramos estados hiperbilirrubinémicos de indirecta con captación de la B.S.P. normal, deben ser interpretados como déficit de conjugación glucurónica, ya que la bromo utiliza otros sistemas de conjugación diferentes a los de la bilirrubina. Así sucede con ciertas formas de Gilbert adquirido (post-hepatitis) por haberse menoscabado la función de conjugación hepática.

Los valores "a", "b" y "h" suelen ser constantes en sujetos normales, habiéndose calculado en el hombre (6): "a" alrededor de 0,18; "b", 0,060 y "h" 0,050.

Shani y col. (114), aplicando el test de tolerancia de la B.S.P., calcularon el transporte máximo ( $T_m$ ) y la capacidad de almacenaje ( $S \rightarrow$  Storage) en 15 pacientes con síndrome de Dubin-Johnson, 13 pacientes con hepatopatías y 13 normales. En los enfermos con hepatopatías, el  $T_m$  y  $S$  estuvieron reducidos, tanto en ictericia hepatocelular con obstructiva. En el síndrome de Dubin-Johnson el  $T_m$  fue prácticamente cero (nula excreción), mientras  $S$  estuvo dentro de los límites normales; según Wheeler, Arias, etc. este test es patognómico de ictericia idiopática crónica.

En la fig. 8 hemos representado, esquemáticamente, todo lo referido anteriormente sobre la captación, conjugación y excreción de la bilirrubina por el hepatocito.

### DESTINO DE LA BILIRRUBINA EN EL INTESTINO.-

Excretada la bilirrubina conjugada por el hepatocito, aquélla ingresa en los canaliculos biliares. La ausencia de gradiente de presión hidrostática entre los sinusoides y los canaliculos biliares, excluye la posibilidad de una filtración hidrostática al origen de la bilis (49). El mecanismo inicial de la coleresis parece ser, como propuso Sparber, la secreción activa de sales biliares por los hepatocitos en los canaliculos. Esta secreción provocaría un gradiente de presión osmótica, estimulando la difusión pasiva del agua y de los iones difusibles. Dicho proceso tiene como consecuencia la formación de una bilis en la que la concentración de sales biliares es elevada y la concentración de electrolitos próxima a la del plasma. En las vias biliares tienen lugar procesos de reabsorción (de soluciones isoosmóticas e isoelectricas de cloro y de sodio) y de secreción (fundamentalmente de bicarbonatos).

Así, vehiculada por la bilis, la bilirrubina, a través de las vias biliares, llega al intestino. En éste encontramos fundamentalmente bilirrubina conjugada; dentro de ésta la fracción más importante es el pigmento II, aunque tambien se encuentra, como ya hemos dicho, pigmento I, en una proporción del 25%. Ya hemos intentado explicar este origen, lo mismo que para la bilirrubina no conjugada, aunque esto último es más difícil de comprender, habiendose atribuido fundamentalmente a la actuación de la beta-glucuronidasa, que deconjugaría al pigmento ya copulado con el ácido glucurónico. Esta bilirrubina no conjugada sería reabsorbida por la pared intestinal y, ganando el hígado, conseguiría ser conjugada y reexcretada. En cambio, solo escasas cantidades de bilirrubina conjugada se reabsorben. Este hecho tiene gran significación biológica (109) ya que muchas membranas celulares lipóideas, tales como la placenta, la barrera hematoencefálica, el epitelio

biliar y el epitelio del tubo digestivo, son virtualmente impermeables a aniones orgánicos del tamaño y carga de la bilirrubina conjugada; si la bilirrubina fuese excretada en su forma liposoluble no conjugada, una difusión posterior a través de la superficie mucosa del árbol biliar y del tracto intestinal comprometería severamente la eficacia del proceso excretor, resultando inútil el mismo. Con ello, la conjugación confiere al pigmento otra propiedad, la de limitar su reabsorción, siendo obligada su eliminación fuera del organismo. Laster y Schmid (75) administraron, mediante infusión intestinal, bilirrubina- $C^{14}$  conjugada y no conjugada a pacientes con drenaje biliar externo, observándose que la forma no conjugada era rápidamente reabsorbida, en tanto que la forma conjugada se eliminó prácticamente en su totalidad por las heces.

Los conjugados de bilirrubina que encontramos en el intestino no son solo los glucurónidos. Ya vimos anteriormente que la bilirrubina se puede conjugar con sulfatos, disacáridos, etc. y todos ellos pueden ser detectados aquí. Fevery y col. (51) obtuvieron bilis duodenal por sondaje, así como de tubo en T en pacientes intervenidos por litiasis biliar, analizándola. El etil-antranilato diazotizado fué utilizado para la determinación del pigmento biliar conjugado total, y por cromatografía en capa fina se hizo el análisis de los azopigmentos derivados. Con cloroformo fueron extraídos escasas cantidades de bilirrubina no conjugada. Comprobaron que la bilis normal y la de rata proporcionan similares tipos de azopigmentos:

El componente dominante es el azopigmento delta (azodipirrol-beta-D-monoglucuronizado). Pequeñas cantidades de azopigmentos con complejas estructuras de conjugación (gamma-azopigmentos) fueron detectados. También se encuentran pequeñas cantidades de azopigmentos que contienen xilosa o glucosa (llamados alfa-2 y alfa-3, respectivamente). Bilirrubina monoconjugada (calculada del porcentaje de azodipirrol) se encontró en un 22% de la totalidad de pigmentos de la bilis humana y en un 39% en la bilis de rata. En ambos, el componente principal fué la bilirrubina diglucuronizada.

De la bilis de pacientes con enfermedad hepática adquirida se aisló un nuevo grupo de azopigmentos (beta-azopigmento). El grupo gamma-azopigmentos estaba incrementado. El grupo delta- estuvo disminuido. El porcentaje de beta-azopigmento mostró una correlación positiva con la concentración de bilirrubina

sérica . Con estas determinaciones no fué posible la diferencia entre colestasis intra y extrahepática. La recuperación de la enfermedad se acompañó de normalidad de los tipos de azopigmento.

En las ratas, la obstrucción biliar indujo aumento de beta y gamma-azopigmentos y disminución de los delta-, similar a lo observado en el hombre, pero a diferencia de éste, en aquéllas se normalizaron completamente después de seis horas de suprimir la obstrucción biliar (que había durado de 15-21 horas); en el hombre no se había conseguido al cabo de diez días después de la intervención.

Léster y col. (76) estudiaron la excreción biliar de cuatro tetrapirroles (bilirrubina, mesobilirrubinógeno, mesobilirrubina y i-urobilina ópticamente inactiva) marcados con  $H^3$ , radioquímicamente puros, en ratas normales y ratas Gunn, después de su administración intravenosa. En las especies normales, el 90% de la bilirrubina y mesobilirrubina fué excretado en forma de conjugado glucurónido. Por el contrario, la mayor fracción de mesobilirrubinógeno y i-urobilina aparecieron en la bilis intactos e inalterados, los mismo que en ratas Gunn. Estas tampoco conjugaron la bilirrubina y mesobilirrubina a derivados glucuronizados. Estos estudios sugieren que la conjugación glucurónida de los pigmentos biliares puede ser gobernada por una configuración molecular específica: insaturación de los puentes tetrapirrólicos externos (a y c).

Sean cuales fueren los pigmentos biliares llegados al intestino, aquéllos no conjugados son susceptibles de reabsorción, como dijimos, volviendo al hígado para su conjugación y reexcreción. También una pequeña fracción de los conjugados pueden reabsorberse, llegando al hígado para su reexcreción o derivando al riñón para su eliminación urinaria. En ambos casos tiene lugar el llamado "circulo entero-hepático de la bilirrubina" (fig. 9), el cual puede adquirir gran importancia, en ciertas circunstancias, contribuyendo al entretenimiento de una ictericia. Poland y col. (90), para valorar el papel de la circulación enterohepática de bilirrubina en la ictericia fisiológica del recién nacido, suplementó la dieta de nueve neonatos con ágar, que adsorbe y estabiliza la bilirrubina en solución acuosa, impidiendo su reabsorción intestinal, con lo que la ictericia fisiológica no llegó a presentarse durante los cinco días del experi-

B. C. - Bilirrubina conjugada.  
B. N. C. - Bilirrubina no conjugada.

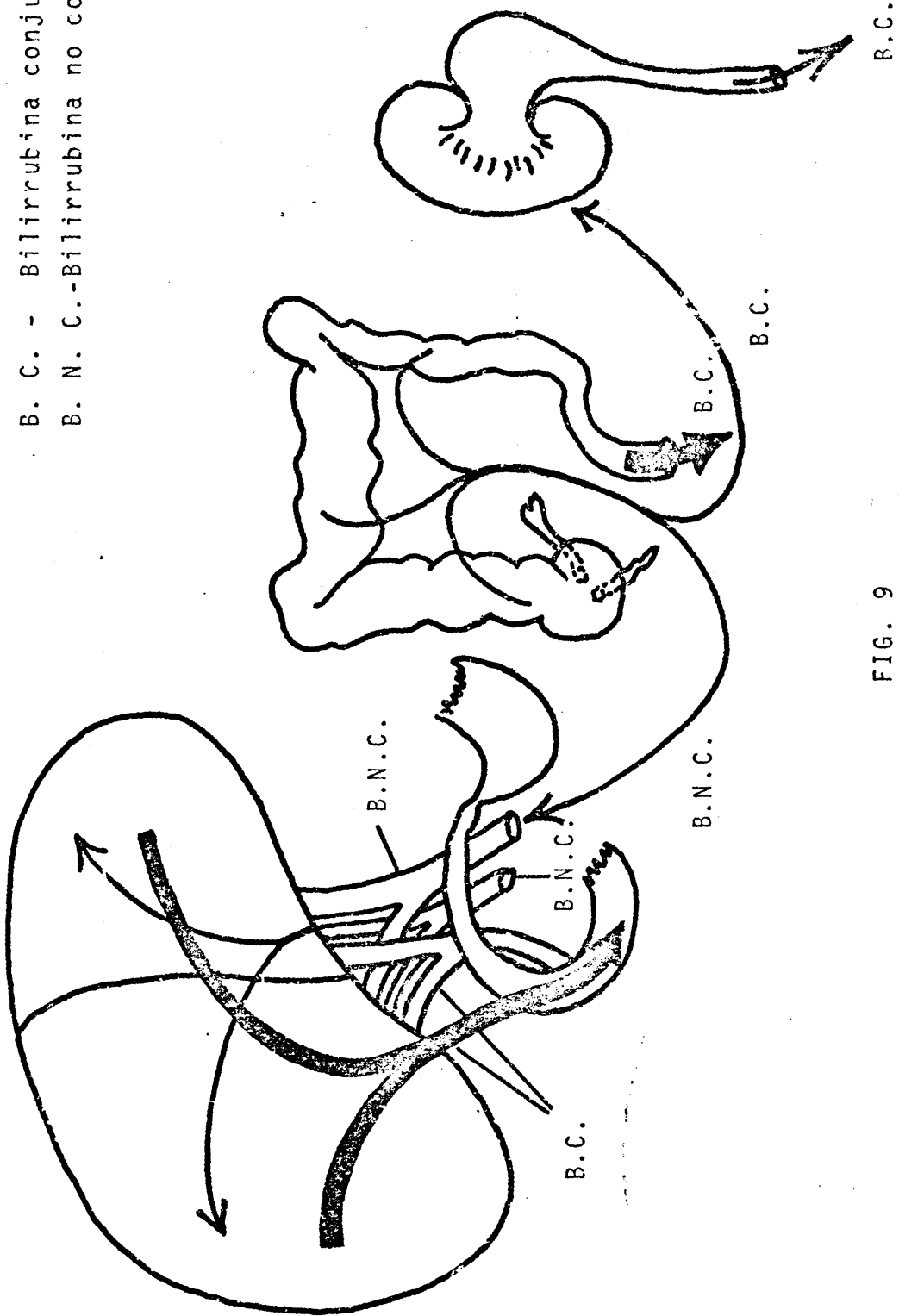


FIG. 9

CIRCULACION ENTEROHEPATICA DE LA BILIRRUBINA.

mento; la eliminación de bilirrubina por las heces incrementó en los niños tratados con ágar. Otros autores (46) hacen extensiva la existencia de esta circulación enterohepática no solamente para la bilirrubina, sino también para otros pigmentos biliares, urobilinógenos, sales biliares, colesterol, fosfolípidos, glutatimida, ampicina, vit B<sub>12</sub>, metabolitos de varios esteroides, hormona tiroidea o contrastes colecitográficos (ácido yopanoico, por ejém., que puede contribuir a la permanencia de una vesícula opacificada durante muchos días).

Sin embargo, la mayor parte de la bilirrubina que llega al intestino es transformada por las bacterias intestinales en diversos pigmentos (37,48, 122). Los procesos bioquímicos que tienen lugar están representados en la fig. 10 y la estructura química de los derivados bilinógenos y bilínicos se representan en la figura 11.

En el intestino, los dos puentes meteno ( $-CH=$ ) y usualmente los dos grupos vinílicos ( $-CH=CH_2$ ) de la bilirrubina, son reducidos por las bacterias intestinales. Los componentes incolores resultantes son los urobilinógenos excretados en las heces. Las urobilinas derivan de los urobilinógenos por dehidrogenación de los anillos medios; son pigmentos anaranjados que se eliminan con las heces y se llaman así por haber sido encontrados por vez primera en la orina, donde se eliminan a partir de la reabsorción intestinal.

La reducción de la bilirrubina es catalizada por deshidrogenasas producidas por organismos anaerobios (bacterias intestinales: *Clostridium*, *B. purificum*, *E. coli*, etc. 122). El intestino estéril, como en el recién nacido o por tratamiento con antibióticos (neomicina) en el adulto, es incapaz de reducir la bilirrubina, no proporcionando los referidos derivados.

Los derivados bilinógenos y bilínicos, eliminados con las heces y a las que prestan su color característico, contabilizan, aproximadamente, unos 250-300 mgr. en las 24 horas, exactamente la misma cantidad formada de bilirrubina al día, por lo que la determinación de los mismos constituye un índice bastante aproximado de la hemólisis. Su proporción disminuye o desaparece en los casos de obstrucción incompleta o completa, respectivamente, de vías biliares, o por eliminación de la flora bacteriana, como acabamos de reseñar.

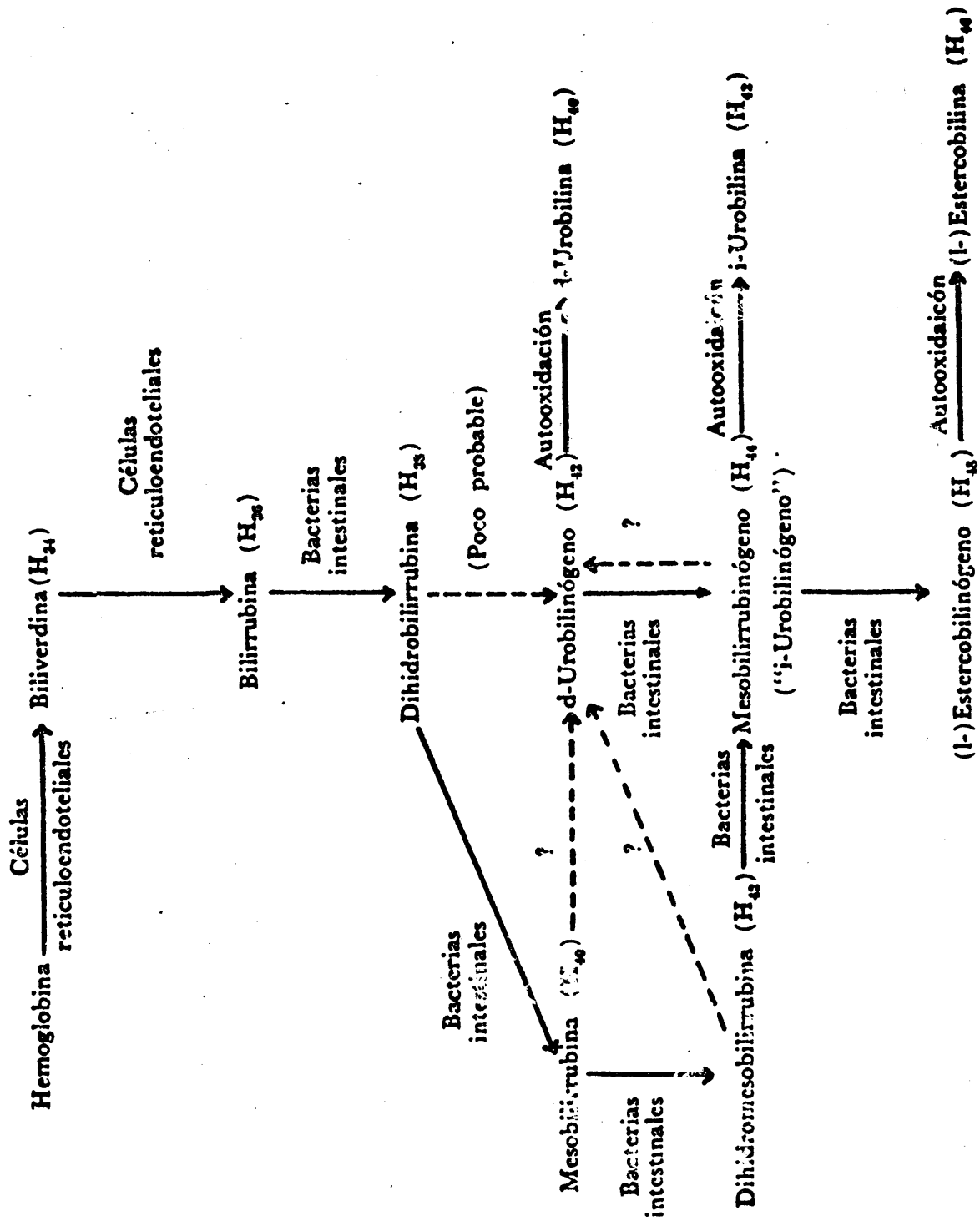


FIG. 10 TRANSFORMACION DE LA BILIRRUBINA POR LAS BACTERIAS INTESINALES (CANTAROW)

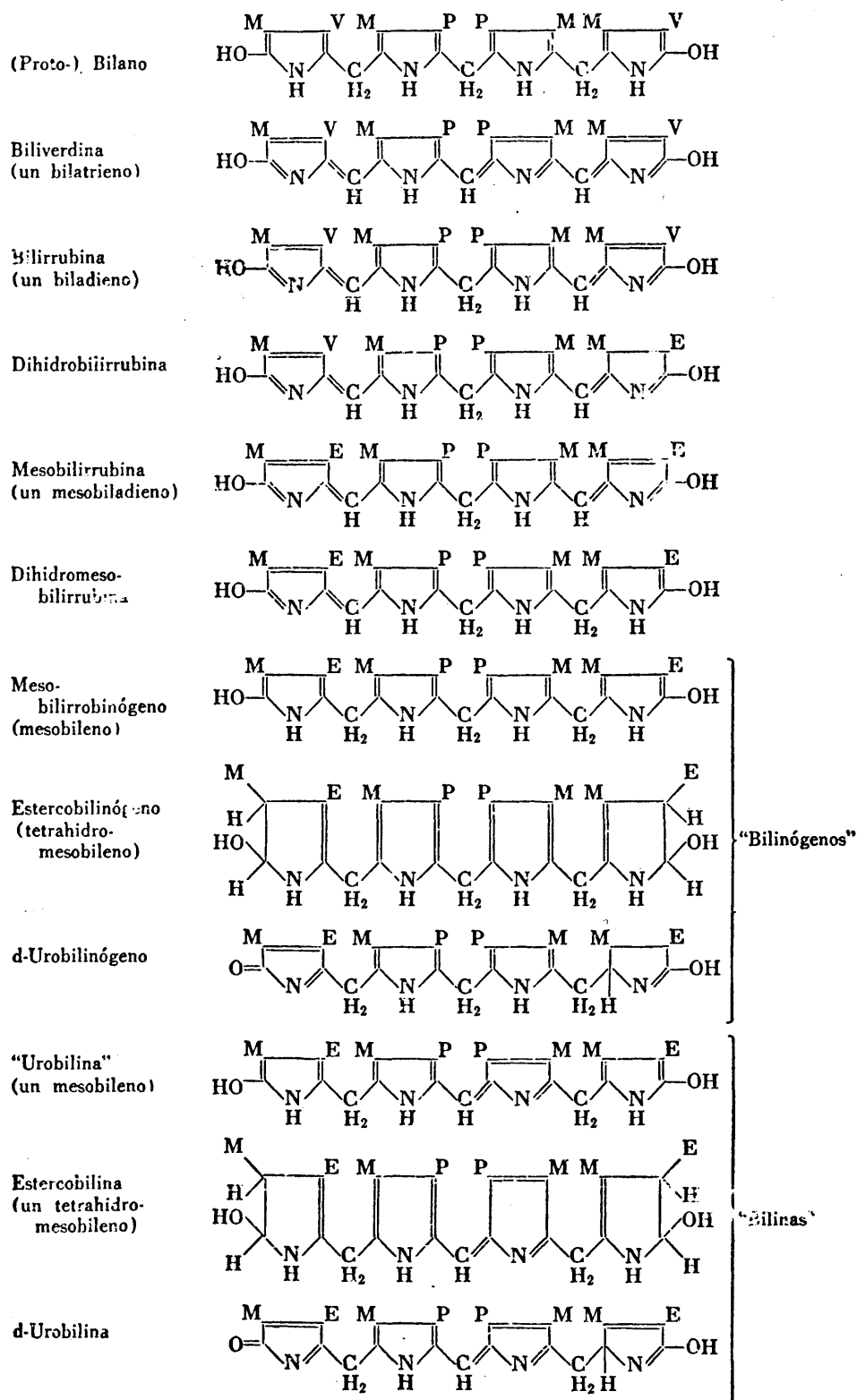


FIG. 11 ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS PIGMENTOS BILIARES



De todas formas, dado que la conversión de bilirrubina a urobilinógeno no es estequiométrica (48), las determinaciones de urobilinógeno fecal no aseguran la medida del catabolismo de Hem.

Una parte de estos derivados de bilirrubina son reabsorbidos en el intestino, pasando a la circulación sanguínea, desde donde la mayoría es captada por el hígado y reexcretada, constituyéndose así otro círculo enterohepático de los pigmentos biliares. En casos de menoscabo de la función hepática, no puede ser excretados por el hígado y se eliminan por el riñón, apareciendo en la orina. El urobilinógeno, que, ha sido el mejor estudiado en este sentido (48,74), ha sido determinado en la orina e interpretado clásicamente como signo de enfermedad hepática (74,122) o de obstrucción total de vías biliares, así como de hemólisis incrementada: respecto a esto último, ya hemos indicado su infidelidad, a causa de la transformación no estequiométrica de bilirrubina en urobilinógeno, así como variable reabsorción intestinal y excreción renal (los niveles urinarios de urobilinógeno varían con las horas del día, probablemente debido a cambios del PH). Léster y col. (74) estudiaron la reabsorción y reexcreción del urobilinógeno, empleando un isótopo radiactivo del mismo, el mesobilirrubinógeno- $C^{14}$ , administrándolo a los pacientes por infusión duodenal o en el ileón terminal. El isótopo se absorbió en el intestino proximal y distal y fue reexcretado predominantemente por la bilis. Curiosamente, la absorción en el intestino grueso, lugar fisiológico de formación del pigmento, fue mucho más baja que en el duodeno. El mesobilirrubinógeno- $C^{14}$  absorbido no fue transportado ni por la pared del intestino ni por el hígado. La administración concomitante de antibióticos de amplio espectro hizo desaparecer el urobilinógeno de la orina.

### EXCRECION RENAL DE LA BILIRRUBINA.-

Si bien la excreción principal de bilirrubina del organismo se hace por el hígado, a través de la bilis, siendo este aserto fundamentalmente válido en condiciones fisiológicas, una parte del pigmento circulante en plasma es excretada por el riñón. Dicha fracción de bilirrubina eliminada con la orina, es exigua en condiciones fisiológicas, pero adquiere gran incremento en circunstancias patológicas, sobre todo cuando el hígado es incapaz de eliminarla adecuadamente. Incluso en ocasiones extremas (ictericia obstructiva completa) el riñón se convierte en el principal, si no el único, órgano excretor de la bilirrubina, ejerciendo así una incuestionable función vicariante de la excreción hepática.

La importancia de la excreción renal de bilirrubina ha preocupado siempre a numerosos investigadores, por lo que los trabajos publicados han sido numerosos, entre los que hemos seleccionado aquí algunos de los más importantes para su comentario (1,7,8,9,10,11,12,13,14,15,18,27,28, 36,38,44,50,53,54,55,56,57,58,60,61,64,71,73,77,83,89,91,95,117,120,121, 126,127,128,130).

Dado que la eliminación renal de la bilirrubina depende de muy diversos factores, para una mejor comprensión del mecanismo de la misma iremos analizando aquéllos de una forma ordenada, según el siguiente esquema:

- 1) Niveles séricos de bilirrubina. Umbral renal de bilirrubina.
- 2) Estado de conjugación de la bilirrubina.
- 3) Estado de la función hepática.
- 4) Unión proteica de la bilirrubina. Dializabilidad y disociabilidad.
- 5) Función renal. Diuresis
- 6) Influencias del PH sanguíneo y urinario en la eliminación renal de bilirrubina.
- 7) Excreción renal del urobilinógeno.

Cada uno de estos factores juega un papel más o menos importante en la eliminación urinaria de la bilirrubina. En algunos no es bien comprendido su mecanismo de actuación y las hipótesis postuladas por unos y otros autores son, a menudo, contradictorias. Nosotros los iremos comentando por separado, para una mejor asimilación, pero teniendo presente que muchos de ellos se conjuntan en su actuación y esto dificulta esclarecer su grado de participación en el proceso excretorio renal del pigmento.

1) Niveles séricos de bilirrubina. Umbral renal de bilirrubina.-

Toda sustancia que es capaz de ser eliminada por el riñón lo hace a partir de determinadas concentraciones en el plasma, como sucede, por ejemplo, para la glucosa. A esta concentración plasmática por encima de la cual la sustancia aparece en la orina, se le llama umbral renal, y ha preocupado, desde los primeros trabajos publicados, determinar el mismo para la bilirrubina. With (127) determinó bilirrubina sérica y urinaria en diversos pacientes ictericos, llevando dichos valores a abscisas y ordenadas, observando una relación lineal entre ambas. Llegó a la conclusión de un umbral renal de bilirrubina en orina de alrededor de 5 mgr% en plasma, aunque algunos de los casos aportados presentaron pigmento urinario con una concentración sérica de 3 mgr% y en otros no se apreció bilirrubinuria hasta que la concentración sérica del pigmento no alcanzó los 7 mgr%, incluso un enfermo con un nivel sérico de 11 mgr% no presentó bilirrubinuria en ausencia de insuficiencia renal; finalmente, otro caso con 12 mgr% de bilirrubina plasmática no presentó bilirrubinuria, pero este paciente presentaba grave insuficiencia renal. Este autor halló, además, que la cantidad de bilirrubina urinaria era del 25-50% de la cantidad de bilirrubina sérica; las dispersiones, no obstante, fueron bastantes considerables. No encontró diferencias del umbral renal de bilirrubina entre hepatopatías e ictericia obstructiva. Tampoco encontró relación entre el aclaramiento renal de bilirrubina y el de urea, y sí la halló para la diuresis, aumentando la bilirrubinuria con ésta. En el mismo año, Halász (61) postuló que la cantidad de bilirrubina de la orina dependía de la cantidad de ésta en sangre, no encontrando relación con su origen (hepatocelular u obstructiva). En contra de esos dos autores y también posteriormente, utilizando la técnica de fotometría directa y diazorreacción (12), en el mismo año, Barac (10) llega a la conclusión de que la con-

tividad de bilirrubina en la orina no depende en modo alguno de la cantidad total del pigmento en sangre, sino de sus condiciones fisicoquímicas en el plasma (conjugación, solubilidad, unión proteica, etc.). Unos años atrás, Rabinowitch (95) ya había preconizado que existía un umbral renal para la bilirrubina mucho más bajo de lo que generalmente era aceptado, encontrando el pigmento en orina aún a concentraciones normales del mismo en sangre; pero las limitaciones de la metodología empleada para su determinación no permitían mayores conclusiones.

Es interesante observar (27) el hecho de que en una hepatitis, cuando aún los niveles de bilirrubina directa en plasma son bajos (0,2-0,4 mgr%), ya aparece bilirrubinuria (Watson; Pollock, citado por 71); y el hecho opuesto: al disminuir o desaparecer la ictericia, desaparece la bilirrubinuria cuando la bilirrubina sérica está alrededor de 5-8 mg%.

Por otro lado, repetidas veces comprobamos en la clínica coluria y bilirrubina en orina en cantidades elevadas, para una determinada concentración plasmática unas veces, y otras, a la misma concentración sérica la orina es casi acolorada, con bajas tasas del pigmento en la misma, dependiendo ello de la causa de la ictericia.

Deberíamos, por tanto concluir que la concentración de bilirrubina total en orina no guarda relación solo con la concentración total de la misma en sangre, sino que ello depende, además, de otros factores (9).

## 2) Estado de conjugación de la bilirrubina.-

Clásicamente, la orina de la ictericia hemolítica es "acolorada", mientras que la de la ictericia obstructiva es francamente "colorada", aunque en ambos casos encontremos cantidades similares de bilirrubina total en plasma. Por otro lado sabemos que la bilirrubina predominantemente en el suero de enfermos con hemólisis es de tipo indirecto, mientras que la de la ictericia obstructiva es predominantemente de tipo directo. Esta simple observación nos habla de la importancia del estado de conjugación de la bilirrubina plasmática para su eliminación por la orina.

Dado que, en esencia, como ya dijimos, la diferencia fundamental entre un tipo y otro de bilirrubina reside en su distinta solubilidad en medio acuoso, es lógico atribuir la distinta eliminación renal a dicha propiedad.

En efecto, todos los autores estan de acuerdo en que la bilirrubina predominantemente en la orina es la de tipo conjugado (24,25,27,53,57,92,121) y dentro de élla, la de mayor proporción, es el pigmento II (1,91), por ser tambien el más soluble.

Sin embargo, diversos autores (8,13,120,128) encontraron bilirrubina en orina en circunstancias de franco predominio de bilirrubina no conjugada en plasma. With refuta a Young (128) que la bilirrubinuria solo tenga lugar con la de tipo directo, por ser una forma "libre", alegando el primero que tal estado no existe, ya que la bilirrubina está fuertemente unida a la albúmina y solo es posible su desunión por el hígado, o separada de la proteína por medio de la secreción tubular, no dependiendo del tipo de pigmento. Van der Stock (120) encuentra excreción urinaria de bilirrubina después del incremento plasmático de la concentración de HB en el perro, sin que la tasa sanguínea de bilirrubina ni el aclaramiento de creatinina sufriesen cambio alguno; estos resultados le hizo suponer un metabolismo local de la hemoglobina en el riñón, transformandose en bilirrubina. En este sentido Pimstone (89) refiere que, cuando en un estado hemolítico, la capacidad de unión de la hemoglobina a la haptoglobina se excede, la hemoglobina "libre" es rápidamente filtrada por el glomérulo (en forma de dímeros que luego se reconstruyen) y en parte reabsorbida por el túbulo proximal, apareciendo hemoglobinuria cuando esta capacidad de reabsorción es excedida. La hemoglobina reabsorbida es catabolizada localmente a bilirrubina, monóxido de carbono y aminoácidos, por los sistemas enzimáticos de las células del epitelio del túbulo proximal. Esta bilirrubina localmente formada pasa a la sangre y es rápidamente excretada por la bilis, mientras que el hierro liberado es lentamente movilizado. Pero si aquélla capacidad de formación renal de bilirrubina y posterior excreción hepática son excedidos, parte de la bilirrubina puede ser eliminada, probablemente después de su conjugación, por el riñón. Finalmente, Barac (7,8,13) encontró importante bilirrubinuria en perros a los que se les inyectaba bilirrubina no conjugada intravenosa. Este autor realizó el estudio en perro entero, en perro hepatectomizado y en riñones aislados perfundidos. En el perro hepatectomizado, la bilirrubina fué más intensa (no se trata, por tanto, de una bilirrubina conjugada por el hígado y posteriormente eliminada por el riñón). En los riñones aislados, perfundidos con bilirrubina no conju-

gada, tambien se observó marcada bilirrubina (con lo que eliminábamos otros lugares del organismo capaces de conjugar bilirrubina). De resultados de estos experimentos debemos concluir: a) O el riñón es capaz de lininar bilirrubina no conjugada. b) O el riñón conjuga bilirrubina previamente a su excreción. El autor comunica que la bilirrubina eliminada daba positiva la reacción diazoica teniendo que concluir que el riñón conjugaba la bilirrubina a derivados glucurónicos.

Resumiendo, de todo lo antedicho se desprende la importancia de la conjugación, y por tanto de la solubilización, de la bilirrubina para su eliminación renal. Sin embargo, aunque de gran importancia, no es éste el único, y quizá tampoco el principal, factor que regule la eliminación renal de la bilirrubina, como veremos más adelante.

### 3) Estado de la función hepática.-

Ya acabamos de indicar la trascendencia de la conjugación para la bilirrubinuria. Dado que el principal órgano de aquél proceso es el hígado, es lógico suponer que un menoscabo en la función hepática deba influir en la eliminación renal de bilirrubina. Sin embargo, no es solo a través de una conjugación perturbada el que el hígado influya en dicha eliminación.

Nos llama la atención en la clínica el hecho de que en una ictericia obstructiva, con importante bilirrubinuria, al prolongarse la obstrucción y deteriorarse la función hepática, aún prevaleciendo en sangre la bilirrubina conjugada, el riñón eliminaba relativamente menor cantidad de bilirrubina.

With (130) así como Halász (61) no encontraron diferencias, en la bilirrubinuria, entre enfermos hepáticos e ictericia obstructiva. Fevery y col. (50) observaron diferencias importantes en la eliminación renal de bilirrubina entre ictericias obstructivas y hepáticas crónicas o cirrosis, siendo menor dicha eliminación cuanto más mermada estaba la función hepática, es decir, en las cirrosis, aún con cantidades similares en plasma de bilirrubina conjugada. Ellos lo atribuyeron, en parte, al papel de las sales biliares, solubilizando la bilirrubina, por lo que, al estar más disminuida su síntesis en las cirrosis, la bilirrubina era menor en éste último grupo. Una prueba objetiva la obtuvieron al administrar a los pacientes Decholin (preparado rico en sales biliares), con

lo que la bilirrubinuria de los hepáticos aumentaba.

Finalmente, otras funciones hepáticas juegan un papel importante en la bilirrubinuria, como sucede con la síntesis de proteínas, ya que estas desempeñan una misión transcendental en el transporte y solubilización del pigmento sérico. Pero esto lo veremos en el apartado siguiente.

#### 4) Unión proteica de la bilirrubina. Dializabilidad y disociabilidad de la misma.-

Ya hemos comentado ampliamente en el capítulo sobre la circulación plasmática de la bilirrubina, cómo ésta se une a la albúmina para su salubilización. Esta unión, no bien conocida, es más fuerte para la forma no conjugada que para la conjugada. Ya Barac (11) en 1946 resaltaba el hecho de que, como la bilirrubinuria no se acompaña de albuminuria, había que deducir que la bilirrubina se disociaba de la albúmina para su eliminación renal. Este mismo autor comentaba, como resultado de sus experiencias, que dicha separación de la bilirrubina de la albúmina no era debida a una acción hidroxilásica y que el pigmento tampoco estaba unido a la albúmina por medio de los grupos carboxílicos. Y en un trabajo posterior (9) el mismo autor comunica que dicha unión albúmino-bilirrubínica es escindida por el propio riñón, previamente a su eliminación urinaria, ya que por experimentos previos y estudios posteriores de aquél investigador (14) se había demostrado la no existencia de bilirrubina "libre", debido a la mala solubilidad del pigmento en medio acuoso a PH fisiológico y la gran habilidad de unión de la bilirrubina por la albúmina.

Fulop y col. (56), repitiendo estudios de comunicaciones realizadas por Hoover y Blankenhorn en 1916, que observaron que la bilirrubina era ligeramente dializable del plasma de pacientes ictericos que tenían bilirrubinuria y no dializable del plasma de pacientes ictericos acolúricos, concluyeron que una pequeña fracción de la bilirrubina conjugada del plasma de perros y pacientes con ictericia obstructiva era dializable. Postularon que probablemente constituiría la fuente de la bilirrubina urinaria y observaron que era retenida en el plasma de enfermos o perros urémicos; la bilirrubina no conjugada no era dializable después de su adicción a plasma normal.

Cameron y col. (36), realizaron estudios con bilirrubina-C<sup>14</sup> en niños con atresia biliar. La inmensa mayoría del isótopo recuperado apareció en la

orina; una fracción pequeña se eliminó con las heces, probablemente segregada con los jugos pancreáticos e intestinal, comprobado en monos y perros con ictericia obstructiva experimental. Concluyeron que en circunstancias de obstrucción biliar, la eliminación de bilirrubina del organismo está bajo la dependencia fundamental del aclaramiento renal de bilirrubina, a su vez por filtración glomerular. La fracción de bilirrubina conjugada útil para la filtración glomerular, se cree estar unida, no a la albúmina, sino a un polipéptido o pequeña fracción proteica que migraría electroforéticamente con las alfa o beta-globulinas. Tal vez el tipo o habilidad de esta pequeña fracción dializable dependa de una adecuada función hepática, por lo que el hígado, y no el riñón, controlaría la excreción renal de bilirrubina.

Por tanto, parece evidente que la bilirrubina unida a una proteína (albúmina, alfa o beta-globulina), ha de disociarse de ella para su excreción renal. El tipo de unión con la proteína y el órgano o lugar de la escisión no es bien conocida. La unión es más laxa con la bilirrubina conjugada y esto podría constituir un factor favorable de la prevalencia de esta forma de bilirrubina en la orina.

Ciertas sustancias que se unen competitivamente con la albúmina, como sulfamidas, salicilatos, etc. podrían desplazar a la bilirrubina de su unión con la proteína, facilitando así la excreción renal (55) o el paso a los tejidos (ictericia nuclear).

##### 5) Función renal. Diuresis.

El primer problema que se plantea con la bilirrubina al llegar a la nefrona, para su eliminación, es su disociación de la albúmina. Ni el tipo de unión con la albúmina ni el mecanismo de la separación de ella, son bien conocidos. En relación a lo primero ya dijimos anteriormente, por trabajos de Barac (11), que parecía que dicha unión no era ni por los grupos hidroxílicos ni por los carboxílicos; por otro lado, en otras comunicaciones del mismo autor (9), esta escisión parece que tenía lugar a nivel del propio riñón.

Un segundo problema, clásicamente muy debatido y contradictorio, es el de si la bilirrubina se elimina por filtración glomerular o por secreción tubular.

Desde las primeras observaciones en autopsias de enfermos ictericos, en las que solamente el túbulo proximal aparecía teñido de amarillo, se pensó que



la eliminación urinaria de la bilirrubina se realizaba por secreción tubular. Nizet y Barac (83), mediante técnicas histoquímicas especiales (transformación de la bilirrubina en biliverdina por ciertos agentes oxidantes:  $\text{NaO}_2$ , yodo en solución alcohólica, etc.) consiguieron localizar la bilirrubina a nivel del túbulo proximal y de la porción ancha del asa de Henle. Sin embargo, estos autores añadieron que tales hallazgos no excluían la presencia del pigmento a otros niveles de la nefrona bajo una forma no evidenciable por las técnicas por ellos empleadas.

Para aclarar este enigma, que aún hoy permanece en la duda, se han realizado sucesivamente varios experimentos que han culminado en importantes progresos.

En primer lugar, asumiendo un posible mecanismo de filtración glomerular, se determinaron conjuntamente aclaramientos de creatinina y de bilirrubina, no obteniéndose conclusiones útiles, dada la diversidad de resultados, pues incluso con aclaramientos de creatinina bajos, los aclaramientos de bilirrubina permanecían con frecuencia normales.

Abordando la posibilidad de una secreción tubular, Williamson y col. (126)<sup>124</sup> aplicaron la técnica de Sperber en el pollo: provocaron altas concentraciones peritubulares de bilirrubina directa e indirecta, cada una en un riñón del animal, no obteniéndose, en la eliminación urinaria de bilirrubina, diferencias unilaterales. Por otro lado, inyectaron en el mismo animal, en vena, ambos tipos de bilirrubina, recogiendo en orina solo la forma directa; ni del plasma ni de la orina, la bilirrubina fue ultrafiltrable. Concluyeron en que, aunque el mecanismo no estaba claro, la bilirrubina, y solo la directa, se secreta por filtración glomerular, no pudiéndose evidenciar ningún sistema secretorio tubular.

En el mismo año, Laks y col. (71), admitiendo que la bilirrubina del plasma de enfermos ictericos no era dializable ni ultrafiltrable, infirieron, con otros autores, que la bilirrubina urinaria debía ser derivada del plasma por secreción tubular. Por otro lado, dado que los aclaramientos de bilirrubina estaban constantemente muy por debajo de los de creatinina, esto hacía poco verosímil una excreción del pigmento por simple filtración glomerular. Así las cosas, podían ocurrir dos procesos: o una filtración glomerular pero con posterior reabsorción tubular, o un fenómeno primario de secreción tubular activa. Enton-

ces decidieron estudiar los aclaramientos de bilirrubina y creatinina, pero introduciendo la técnica denominada "renal stop flow", descrita por Malvin y col. en 1958 (79). Esta técnica consistía en lo siguiente (fig. 12) : Se introducía un catéter de polietileno por el uréter hasta su unión con la pelvis renal, siendo entonces fijado mediante ligaduras. Al clampar el uréter, comenzaba a elevarse la presión dentro del sistema urinario, estabilizando a los 60-90 seg. Se le inyectaba, intravenosamente, manitol al perro, para asegurar una diuresis osmótica. Así mismo se inyectaba inulina, substancia que es eliminada exclusivamente por filtración glomerular, pero no reabsorbida ni secretada por el túbulo. Al clampar el uréter, aumentando la presión del sistema, la filtración glomerular se interrumpía ("stop flow"), por lo que la inulina estaba ausente en la orina. Igualmente se inyectaba, también intravenosamente, ácido para-amino-hipúrico, que se excreta por secreción tubular, apareciendo dicha substancia en la orina del túbulo proximal, a pesar del "stop flow". Se sabe así mismo que la creatinina se elimina por el riñón de una manera similar a la inulina, por filtración glomerular, y se administró la misma por infusión intravenosa. El perro había sido hecho icterico por ligadura del conducto biliar común. Se determinaron las concentraciones urinarias de bilirrubina, inulina, sodio y para-aminohipúrico, después de suprimir el "stop flow", que duraba 8 minutos, en diversas muestras de orina recogidas sucesivamente, representando cada una la orina de los tubos colectores, túbulo distal, asa de Henle, túbulo proximal y glomérulo, en este orden.

La inulina estuvo alta en las muestras que representaban la orina glomerular; el para-amino-hipúrico en aquéllas representaban el túbulo proximal; el sodio estuvo bajo en aquéllas muestras que representaban el asa ascendente de Henle y el túbulo distal (lugar de su reabsorción). La bilirrubina estaba elevada en las muestras en que había baja cantidad de sodio, esto es, asa de Henle y túbulo distal, y en muy escasa proporción en las muestras que contenían inulina. Por tanto, los autores concluyeron en que uno de los mecanismos de la eliminación renal de bilirrubina era la secreción tubular distal y del asa de Henle, aunque una pequeña cantidad pudiera ser eliminada por filtración glome-

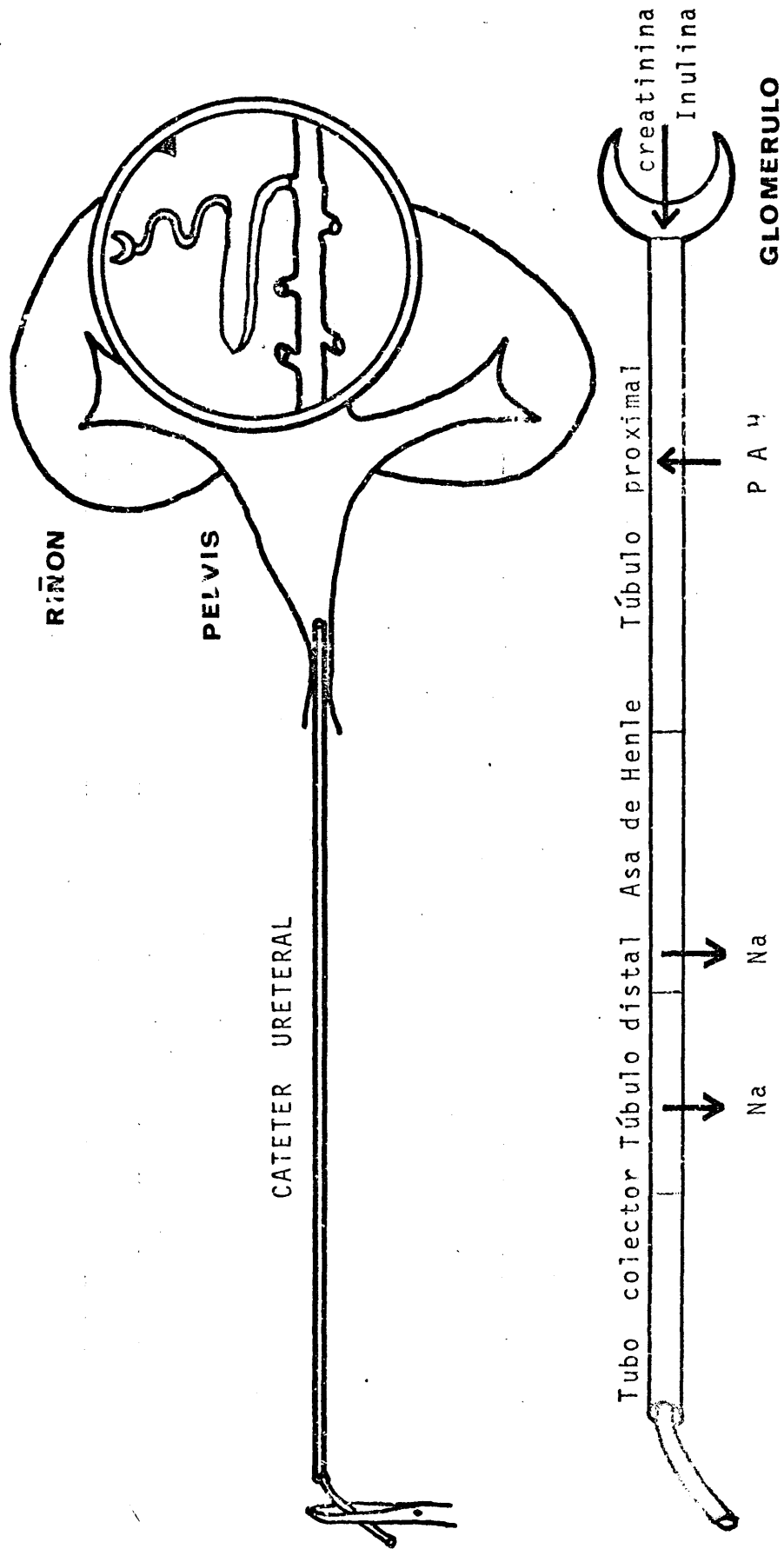


FIG. 12

TECNICA DEL "RENAL STOP FLOW" (Lacks y Col. modificado).

regular, esto último no posible de demostración por el uso de la técnica del "stop flow".

En el mismo mes y año (abril de 1963), Iber y Chipman (64) en perros ictericos mediante ligadura del conducto biliar común, empleando la misma técnica anterior ("stop flow"), con sobrecargas de inulina y para-aminohipúrico, llegaron a la conclusión de que la bilirrubina era excretada por ambos mecanismos, filtración glomerular y secreción tubular, pero postularon que la bilirrubina se filtraba por el glomérulo a causa de la liberación de la albúmina transportadora por desplazamiento competitivo del para-amino-hipúrico.

Un año después, Fulop y Brazeau (55), utilizando la referida técnica de stop flow y administrando inhibidores de la secreción tubular (probenecid), llegaron a la conclusión de que la bilirrubina se eliminaba en la orina fundamentalmente por filtración glomerular, por las siguientes razones: a) El "stop flow", al disminuir la filtración glomerular, disminuía la cantidad de bilirrubina urinaria. b) La administración de inhibidores de la secreción tubular (probenecid) no modificaba la excreción de bilirrubina por la orina. c) La administración de salicilatos, que desplazan a la bilirrubina de su unión con la albúmina, aumentaba la excreción de bilirrubina, atribuido a una incrementada filtración glomerular. No obstante, una pequeña excreción de bilirrubina tenía lugar por secreción tubular.

Wallace y Owen (121), realizando determinaciones simultáneas de aclaramiento de creatinina, inulina y proteínas urinarias de cada muestra, así como de bilirrubina, llegaron a la conclusión de que el pigmento se eliminaba fundamentalmente por filtración glomerular. Estos autores comentan el hecho que no detectar bilirrubina en el dializado de plasma icterico, lo cual, unido a la gran habilidad de la bilirrubina por la albúmina hace prácticamente imposible la existencia de bilirrubina "libre" plasmática, la que seria fuente de la bilirrubina urinaria. Además, en la bilirrubinuria hay ausencia de albuminuria, al menos en cantidades proporcionales a la tasa de bilirrubina. No obstante, aún en el caso hipotético de un paso de bilirrubina unida a la albúmina a través del glomérulo, habría que suponer una posterior reabsorción tubular de la misma, al menos para la bilirrubina indirecta, ya que ésta está ausente en la orina, a pesar de que ambas, directa e indirecta, están unidas a la albúmina.

Esta reabsorción tubular selectiva para la bilirrubina no conjugada, aunque hipotética, merece interés, sobre todo desde los trabajos por Léster y Schmid (75), demostrando recientemente una reabsorción selectiva de bilirrubina indirecta a través de la pared del intestino delgado; un sistema similar de reabsorción selectiva para la bilirrubina indirecta, podría explicar la casi ausencia de la misma en la orina.

Como quiera que estos autores anteriores (121) encontraron similares aclaramientos de bilirrubina en los dos grupos (los que tenían normal el aclaramiento de creatinina y los que lo tenían bajo), esto les hizo suponer la existencia, además, de un mecanismo secretorio tubular para la bilirrubinuria, aunque este sería de menor importancia.

Como la cuestión de si la bilirrubina es filtrada por el glomérulo o secretada por el túbulo, radica en el concepto que se tenía de que ambas bilirrubinas, directa e indirecta, no eran dializables ni ultrafiltrables (por lo cual tenían que ser secretadas activamente por el túbulo para asimilar su presencia en la orina), Fulop y col. (54) reexaminaron el problema de la dializabilidad de la bilirrubina en la ictericia obstructiva, observando que del plasma de estos pacientes, una parte de bilirrubina conjugada era dializable, constituyendo ésta la fuente de la bilirrubina urinaria, no necesitando recurrir a un mecanismo de secreción tubular de la misma, ya que en tales condiciones la bilirrubina podía ser perfectamente filtrada por el glomérulo. La bilirrubina no conjugada no fué dializable, lo que explicaba su ausencia, o exigua presencia, en la orina. Realizando electroforesis del plasma de sujetos ictericos, se vió que la bilirrubina migraba fundamentalmente con la albúmina, pero una pequeña cantidad migraba a la zona de las alfa y beta-globulinas, suponiéndose que esta pequeña banda proteica, un polipéptico de bajo peso molecular, sería el transportador de esa pequeña fracción dializable de bilirrubina conjugada, útil para su excreción urinaria.

En otro trabajo posterior, Fulop y col. (57) estudiaron el comportamiento de la bilirrubina plasmática en perros ictericos mediante ligadura del conducto biliar común, en condiciones de función renal normal y función renal alterada. Observaron que cuando la función renal disminuía aproximadamente a la mitad (por ligadura de un uréter), la bilirrubina plasmática aumentaba, disminuyendo la bili-

rrubinuria . Este aumento del pigmento sérico se asume que corresponde a la bilirrubina dializable, retenida en plasma a causa de la disminución de la filtración glomerular. Los pacientes con hiperbilirrubinemia conjugada que desarrollan fallo renal, están habitualmente muy graves. Esta severidad y el habitual carácter progresivo de su disfunción hepato-renal hacen difícil evaluar el papel que el empeoramiento de la función renal puede jugar en la hiperbilirrubinemia de estos pacientes. Todo ello indica la importancia cuantitativa de la disposición renal para la bilirrubina conjugada cuando ésta no puede ser excretada por sus rutas biliares normales.

Si, como acabamos de exponer, la bilirrubina se elimina por el riñón fundamentalmente por filtración glomerular, los cambios que ésta experimente deben influir en la excreción renal del pigmento. Este hecho es de interés tenerlo presente para explicarnos cambios en la bilirrubinuria en diversas hepatopatías, especialmente en cirrosis hepática con ascitis compensada o descompensada (con respuesta o no a los diuréticos, respectivamente), ya que es sabido por numerosos trabajos, algunos muy recientes (73,117), que en estos pacientes hay una disminución significativa de la filtración glomerular y de la diuresis.

Finalmente, la diuresis ha sido también relacionada con la excreción renal de bilirrubina. Ya comentamos como With (127) encontró relación entre diuresis y bilirrubinuria, aumentando ésta al hacerlo aquélla. Sin embargo, trabajos más antiguos, como el de Haessler y col. (60), concluyeron en que la eliminación del pigmento por la orina no aumentaba con diuresis provocada por la sobrecarga oral de agua, incrementando, en cambio, al administrar soluciones salinas intravenosas.

#### 6) Influencias del PH sanguíneo y urinario en la eliminación renal de bilirrubina.-

La bilirrubina diglucuronizada, que es el principal pigmento biliar de la orina, aunque no ha sido aislada pura, la estructura química asignada a ella indica que se trata de un ácido débil, por lo que, teóricamente, su excreción podría ser influenciada por cambios ácidos-básicos. Para comprobar esta influencia, Alf y Billing (1), estudiaron los efectos de los cambios del PH de la sangre y de la orina sobre la eliminación renal de los pigmentos biliares, en ratas con ictericia, tras ligadura del conducto biliar común, y en pacientes con ictericia Obstructiva.

Administraron cloruro amónico (acidificante del plasma) y acetazolamida (acidificante del plasma y alcalinizante de la orina). Los estudios se realizaron con diuresis osmótica por administración intravenosa de soluciones de manitol con lo que se minimizaban los errores dependientes de la recolección de orina. Se determinaron, a la vez, aclaramientos de creatinina endógena, como índice de filtración glomerular (ya que fué demostrado por Gribetz, van Loon y Crawford eran útiles para una estimación válida del filtrado glomerular en la rata).

En todos los experimentos realizados se observó un incremento de aclaramiento de creatinina en la alcalosis sistémica y una disminución en la acidosis, tanto en ratas como en el hombre. Una respuesta similar se obtuvo con los aclaramientos de bilirrubina, los cuales disminuyeron con la administración de acidificantes del plasma (cloruro amónico y acetazolamida); los aclaramientos de bilirrubina volvían a aumentar con la alcalanización del plasma mediante la administración de soluciones intravenosas de bicarbonato.

La interpretación que los autores dieron a los resultados, sin embargo, no fué, a nuestro juicio, correcta: partían del hecho de que la capacidad de unión de la bilirrubina conjugada con la albúmina disminuía con la alcalosis y aumentaba con la acidosis, por lo que en alcalosis disponíamos de mayor cantidad de bilirrubina "libre", esto es, dializable, útil para la filtración glomerular. Ya comentamos en capítulos anteriores que según diversos trabajos (59,70), además de otros muchos, la bilirrubina estaba totalmente dissociada de las proteínas séricas por debajo de un PH de 5.

Otra interpretación posible, esgrimida por los mismos autores, parece más razonable: la acidosis plasmática facilita la reabsorción tubular de bilirrubina glucuronizada filtrada a través del glomérulo, por lo que su concentración en orina es menor. Por el contrario, la alcalosis disminuye dicha reabsorción tubular de bilirrubina conjugada. No obstante, concluyen los autores, parece poco verosímil que las leves oscilaciones del PH plasmático compatibles con la vida puedan ejercer más que mínimos cambios en la eliminación urinaria de bilirrubina. Por esto habremos de pensar en que otros factores deben estar involucrados para poder interpretar la variable excreción renal del pigmento en respuesta a cambios mínimos del PH plasmático, como pudieran ser cambios del PH urinario, más variables que aquéllos, aunque estos autores no pudieron observar correlación de los aclaramientos de bilirrubina con cambios del PH de la orina.

7).- Excreción renal del urobilinógeno.-

El urobilinógeno, formado en el intestino a partir de la reducción bacteriana de la bilirrubina, es reabsorbido en gran parte en el mismo. Lester y col. (74), utilizando un isótopo radiactivo del urobilinógeno, el mesobilirrubinógeno- $C^{14}$ , estudiaron dicha absorción, comprobando varios hechos: a) La absorción de dicho pigmento es máxima en el duodeno, siendo más baja en el intestino grueso (lugar fisiológico de formación). b) El urobilinógeno no es transformado ni por la pared intestinal ni por el hígado, limitándose este último a su reexcreción. c) Una mínima disfunción hepática o sobrecarga del órgano pueden menoscabar la reexcreción del pigmento, derivando la eliminación del mismo a la vía renal. d) En la determinación del urobilinógeno endógeno, se observó una disminución, hasta la desaparición total de la orina, cuando los sujetos eran tratados con antibióticos que actuaban sobre la flora intestinal.

La excreción renal del urobilinógeno ha sido clásicamente relacionada con situación alterada de la función hepática, ya que en condiciones fisiológicas éste órgano es capaz de reexcretarlo al intestino, no apareciendo en la orina ("circulación enterohepática del urobilinógeno"). Algunos autores (130) sólo encontraron correlación exacta entre ictericia obstructiva completa y ausencia de urobilinógeno en orina, ya que en otras situaciones clínicas los resultados eran dispares. Bourke y col. (28) encuentran, sin embargo, cierta correlación entre disfunción hepática y urobilinogenuria, pero a condición de que se tenga en cuenta las variaciones de la excreción renal del pigmento en relación al pH urinario.

El urobilinógeno es un pigmento mezcla, en variable proporción, de tres componentes químicos estrechamente relacionados:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -urobilinógenos, los cuales derivan enteramente de la reducción bacteriana de la bilirrubina en el intestino: está ausente en el intestino estéril de ratas o tras la administración de antibióticos que reducen la flora intestinal. La producción fecal total de urobilinógeno en adultos normales es de 40-280 mgr. diariamente, y la excreción renal es de 0-4 mgr. por día. El urobilinógeno es excretado por el riñón por una combinación de filtración glomerular, secreción tubular proximal y re-difusión pH dependiente en el túbulo distal (28). Los cambios del pH urinario tienen un profundo efecto sobre la excreción y aclaramiento del urobili-



nógeno, estando éste incrementado en orinas alcalinas y reducido en orinas altamente ácidas. Por esta razón, groseros cambios de la eliminación renal del urobilinógeno pueden tener lugar en ausencia de cambios significativos del urobilinógeno plasmático o de alteración de la función hepática. Ello es importante a la hora de juzgar la fisiología del órgano por la simple presencia de urobilinógeno urinario. Similar razonamiento puede ser aplicado a la hora de inferir el grado de hemólisis por la tasa de urobilinógeno de la orina .

Indénticos resultados obtuvieron Levy y col. (77) utilizando mesobilirrubinógeno tritiado radioquímicamente puro en el perro. Con niveles plasmáticos constantes de urobilinógeno, su eliminación renal varió del 30% al 200% aumentando el pH urinario de 5 a 8. Cuando el pH urinario permanecía constante, los cambios del pH plasmático no tuvieron influencia sobre la excreción renal del urobilinógeno. El probenecid no influyó la excreción renal del urobilinógeno. El flujo urinario solo influía en la urobilinogenuria cuando aumentaba aquél en situación de aciduria. De todo ello se infirió que la excreción renal del urobilinógeno dependía de tres componentes: filtración glomerular, secreción tubular proximal activa y re-difusión pH dependiente en la nefrona distal.

Bernstein (18), utilizando también mesobilirrubinógeno tritiado, observó que los sujetos sanos control aclaraban rápidamente el isótopo administrado intravenosamente, con muy escasa eliminación urinaria del mismo, mientras que los sujetos con enfermedad hepatobiliar tenían muy disminuidos los aclaramientos plasmáticos del pigmento, determinándose elevadas cantidades de radiactividad en la orina.

Podemos, por tanto, concluir, en términos generales, que la presencia de urobilinógeno en la orina puede ser un índice de alteración de la función hepática o de presencia de hemólisis, pero que otros factores, como función renal, pH de la orina, pueden alterar la cuantía del pigmento en la misma, no existiendo buena correlación entre aquellas situaciones clínicas y la tasa urinaria de urobilinógeno, a menos que se tengan en cuenta dichos factores. Por otro lado, en presencia de obstrucción biliar completa, el pigmento está ausente en la orina, así como cuando eliminamos de alguna forma una flora intestinal adecuada para su formación .

Para terminar, quisieramos comentar algo sobre la eliminación renal del ácido glucurónico. Barniville y col. (15) encontraron que la excreción urinaria de ácido glucurónico fue mayor en sujetos ictericos que en los normales, lo que atribuyeron a la eliminación urinaria de bilirrubina como glucurónido. Dentro de los ictericos fue menor cuanto más afectada estuvo la función hepática, interpretado como disminuida conjugación glucurónica de la bilirrubina. En la sobrecarga oral de salicilamida advirtieron, en pacientes con enfermedad de Gilbert, excreción normal de ácido glucurónico: se sabe que en dicha enfermedad está perjudicada la captación de bilirrubina, pero no la captación de salicilamida, por lo que ésta pudo ser eliminada conjugada con el ácido glucurónico.

Gotlied, col. (50) estudiaron la excreción urinaria de ácido glucurónico libre y conjugado en el recién nacido icterico y no icterico. No hubo diferencia significativa en las concentraciones totales de ácido glucurónico entre los niños ictericos y los no ictericos. El porcentaje de ácido glucurónico libre excretado estuvo significativamente más elevado en los niños ictericos. Los niños prematuros estudiados para comparación, mostraron un porcentaje más alto en la excreción urinaria de ácido glucurónico libre que los niños ictericos. Se puede concluir diciendo que cuanto más alta es la concentración urinaria de ácido glucurónico libre, más baja es la capacidad de conjugación del hígado, lo que puede servir como test de función de éste órgano.

La determinación rutinaria de la bilirrubina en orina (38) puede aportar datos orientadores de valor diagnóstico rápido. Un estudio de 2.238 pacientes admitidos en un hospital, determinando la bilirrubina por un test rápido, mediante el uso de tabletas especiales, permitió aceptar o excluir ciertos procesos hepatobiliares desde el ingreso, en un alto porcentaje de casos.

Por todo lo anteriormente dicho, vemos que la determinación urinaria de bilirrubina y sus fracciones, ácido glucurónico, urobilinógeno, etc. pueden aportarnos datos significativos de interés a la hora de enjuiciar una posible hepatopatía, proceso hemolítico u obstrucción de vías biliares, teniendo presentes, no obstante, factores modificadores de la excreción renal de dichos componentes químicos, como acabamos de indicar.

MOTIVO DE NUESTRO TRABAJO

---

PROBLEMAS QUE SE PLANTEAN

---

MOTIVO DE NUESTRO TRABAJO. PROBLEMAS QUE SE PLANTEAN.-

Como acabamos de exponer en la revisión bibliográfica sobre el metabolismo de la bilirrubina, existen numerosos puntos oscuros acerca del mismo. Dentro de él, el apartado sobre la excreción renal del pigmento está lleno de interrogantes y los problemas abordados ofrecen a menudo resultados contradictorios.

En primer lugar, la conducta de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina en el plasma ha sido investigada por escasos estudiosos del problema (Billing y col., Diaz Rubio (Jr.), Diaz Rubio y col., Hoffman y col., Schmid, Schoenfield y col., etc.), la mayoría de ellos de una forma más o menos estática, sin paralela correlación con la tasa de bilirrubina total, directa e indirecta en plasma, estado de la función hepática, etc., de gran importancia para una mejor comprensión de la dinámica de los pigmentos biliares en las distintas situaciones clínicas.

En segundo lugar, el estudio de la conducta de dichas fracciones glucuronizadas de la bilirrubina en orina ha sido llevado a cabo aún por menos investigadores, y en nuestro país solo conocemos los trabajos realizados por Diaz Rubio (Jr.) y Diaz Rubio y col. (43,44).

Por otro lado, dentro del capítulo sobre la excreción renal de bilirrubina, hemos visto la diversidad de factores que intervenían en la misma (pH del plasma y de la orina, estado de la función hepática y renal, cantidad de bilirrubina del plasma y estado de conjugación de ésta, proteínas séricas, etc.) pero solo escasos investigadores se han ocupado de su estudio y dentro de ellos, la inmensa mayoría solo lo han hecho para la bilirrubina directa e indirecta, no refiriendo las fracciones mono-digluconizada, al menos un estudio que abarcase conjuntamente a todos los factores referidos. Por todo ello los resultados aportados son a menudo incompletos y aun contra-

dictorios.

Solo Diaz Rubio entre nosotros (43,44) estudió someramente el comportamiento de dichas fracciones glucuronizadas de la bilirrubina en sangre y orina, calculando sus aclaramientos renales. Pero, no siendo el objeto primordial de su trabajo, tampoco este autor hizo relación de los mismos con otros parámetros susceptibles de modificarlos, tales como el pH urinario o plasmático, estado de la función renal o hepática, etc. por lo que escasas conclusiones puedan obtener de dichos estudios en este aspecto.

Sabemos que si bien la vía principal de excreción de la bilirrubina es a través de la bilis, en diversas situaciones clínicas, y sobre todo en la ictericia obstructiva, el riñón se transforma en un importante órgano excretor de la misma, a veces el más importante, sino el único, supliendo al hígado, por lo que el conocimiento de la excreción urinaria de bilirrubina y los factores que la regulan son de primordial importancia fisiológica. Además, ello nos puede ayudar a comprender ciertas situaciones clínicas de fallo de ambas funciones, como acontece en el síndrome hepatorenal, en el que la excreción renal del pigmento queda seriamente perturbada. En este sentido decidimos abordar el estudio de la conducta de los aclaramientos renales de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina en las ictericias por hepatopatía o por obstrucción de las vías biliares.

Pero es que además, en circunstancias de hemólisis, y cuando el hígado es incapaz de eliminar la gran cantidad de pigmento formado, el riñón puede también contribuir a su eliminación, tal vez después de una monoglucuronización previa del mismo. Por esta razón decidimos, así mismo, estudiar el comportamiento de los aclaramientos renales de bilirrubina en esta otra situación clínica.

Como, por otro lado, eramos conscientes de que numerosos factores son capaces de modificar la eliminación renal del pigmento, estudiamos paralelamente algunos de ellos, para una mejor comprensión de los mecanismos que intervienen en dicha eliminación.

Por todo ello abordamos nuestros estudios persiguiendo las siguientes metas.

1) Conducta de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina en diversas ictericias, tanto en plasma como en orina.

2) Cálculo de los correspondientes aclaramientos renales.

3) Estudio paralelo de la función renal y hepática, que pudieran modificar aquéllos.

4) Estudio de otros parámetros (como pH plasmático y urinario, proteínas séricas y urinarias, diuresis, etc.) que pudieran ejercer alguna influencia sobre la excreción renal del pigmento.

Con este propósito realizamos el estudio en las diversas situaciones clínicas de ictericia, tanto en las de origen hemolítico, como en las debidas hepatopatías o a obstrucción de las vías biliares.

Dado que las tasas de bilirrubina sérica y urinaria y sus fracciones, así como los diversos factores que pueden influir las, varían de un sujeto a otro, y dentro del mismo paciente, de un día a otro, realizamos todas las determinaciones, siempre que fué posible, dentro del mismo día, para poder establecer una más estrecha y correcta correlación.

M A T E R I A L

---

M E T O D O S

---

C A L C U L O S E S T A D I S T I C O S

---

MATERIAL. METODO. CALCULOS ESTADISTICOS.-

A) Material.-

Los sujetos para nuestro estudio fueron divididos en dos grandes grupos:

a) Catorce sujetos sanos.- Nos sirvieron de grupo control. Se llevaron a cabo catorce determinaciones, una por cada uno de ellos.

b) Cuarenta y siete pacientes ictericos.- Se realizaron cincuenta y dos determinaciones, ya que en algunos se hicieron dos o más determinaciones. Este grupo se dividió en diferentes subgrupos:

- 1) Ictericias por hemólisis. Seis determinaciones.
- 2) Ictericias por hepatopatías difusas agudas. Nueve determinaciones.
- 3) Ictericias por hepatopatías difusas crónicas. Dieciseis determinaciones.

4) Ictericias por hepatopatías tumorales. Cuatro determinaciones.

5) Ictericias por obstrucción de vías biliares. Veinte determinaciones.

En total, se realizaron sesenta y seis determinaciones, de las que cincuenta y dos correspondieron a enfermos (ya que en algunos se repitieron y otras fueron incluidas en más de un grupo, por ser mixtos).

Todas las determinaciones fueron realizadas estando al sujeto en ayunas y recogiendo la orina de 24 horas.

Los diagnósticos fueron establecidos en todos los casos clínica y analíticamente, así como por laparoscopia, biopsia hepática por punción ó intervención.

En todos los sujetos se determinaron los siguientes parámetros:

Bilirrubina directa e indirecta en sangre y orina.

Bilirrubina mono y diconjugada en sangre y orina.

PH, densidad, albúmina y volumen minuto de orina.



#### Aclaramiento de creatinina.

Se calcularon los aclaramientos renales de bilirrubina, mono y diconjugada, así como los correspondientes cocientes.

Además, en la mayoría de los pacientes se determinaron otros parámetros: pH de la sangre, albúmina, gamma-globulina séricas, bromo, protrombina, GOT, GPT, LAP y fosfatasa alcalinas.

Todas las determinaciones, siempre que fué posible, se realizaron el mismo día, para una mejor y más correcta correlación de los resultados.

Los enfermos procedieron todos de la cátedra III de Patología Médica del Prof. Díaz Rubio de la Facultad de Medicina de Madrid.

En las tablas I al VI vienen expresados nombre, edad, sexo y diagnóstico de todos los sujetos estudiados.

#### B) Método.

En la determinación de la bilirrubina directa e indirecta, hemos seguido la técnica clásica descrita por Malloy-Evelyn (78). Para la determinación de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina directa hemos utilizado la técnica de Schachter (102) con algunas modificaciones: este método es sencillo, rápido y de suficiente sensibilidad para nuestro propósito. Aunque para la determinación de la bilirrubina se han descrito algunas técnicas posteriores (31), su mayor complejidad y no evidentes ventajas nos ha hecho inclinarnos por las anteriormente reseñadas.

La técnica descrita por Schachter se basa en que al tratar la bilirrubina con el ácido sulfanílico diazotizado proporciona azopigmentos estables, que derivan de pigmentos biliares inestables. De esta forma, un mol de bilirrubina diglucuronizada origina dos moles de azopigmento B, mientras que un mol de bilirrubina monoglucuronizada da lugar a un mol de azopigmento A y un mol de azopigmento B. Una vez formados los azopigmentos, han de ser separados, por su distinta solubilidad, entre butanol-cloróformo y buffer acetato. Finalmente las dos capas así formadas se miden colorimétricamente mediante el fotocolorímetro Beckman. Estimados así los azopigmentos A y B, a partir de ellos calculamos las fracciones mono y diglucuronizadas de la bilirrubina directa.

#### a) Reactivos utilizados.

- 1) Ácido sulfanílico diazotizado.
- 2) Azida sódica.

- 3) Buffer glicina pH 2.
- 4) n-Butanol
- 5) Cloroformo.
- 6) Buffer acetato pH-3.

b) Preparación de los reactivos.-

1) Acido sulfanílico diazotizado. Se pesa 1 gr. de ácido sulfanílico y se disuelve en 500 ml., aproximadamente, de agua destilada. Se añaden 15 ml. de ácido clorhídrico y se enrasa con agua destilada hasta completar 1000 ml. A esto llamamos solución A.

Por otro lado, se pesa 0,5 gr. de nitrito sódico y se disuelve en agua destilada hasta enrasar a 500 ml. Le llamamos solución B y debe renovarse cada 15 días aproximadamente.

El ácido sulfanílico diazotizado está formado por la mezcla de 20 ml de la solución A y 0,6 ml de la solución B, que debe prepararse en el momento de su uso.

2) Azida sódica 0,2 M. Se pesan 2,6 grs. de azida sódica y se disuelven en agua destilada hasta enrasar 200 ml.

3) Buffer glicina pH-2. Se pesan 22,521 grs. de glicina (p.m.=75,07) y se disuelven en agua destilada hasta enrasar 200. A esta solución 1,5 M. de glicina se le añade ácido sulfúrico concentrado hasta ajustar el pH a 2.

4) n-Butanol. Se utilizará cualquiera del comercio, debidamente certificado

5) Cloroformo. Igual que en el caso anterior.

6) Buffer acetato pH-3. Acido acético 2 M: se pesan 60,05 grs. de ácido acético (p.m.=60,05) y se disuelven en agua destilada hasta completar 500 ml. Acetato sódico 2 M: se pesan 54,43 grs. de acetato sódico trihidrato (p.m.=136,09) y se disuelven en agua destilada hasta enrasar 200 ml.

Para preparar el buffer acetato pH-3 se agrega el acetato sódico 2 M al ácido acético 2 M hasta ajustarlo a un pH de 3.

c) Desarrollo de la técnica.-

Las muestras a analizar se obtienen de la siguiente manera: 1) sangre: se hepariniza y se centrifuga, para separar el plasma. 2) Orina: se filtra. En ambos casos se procede rápidamente a la determinación de los azopigmentos,

ya que la luz y el calor los degrada. No obstante, a la temperatura ambiente y luz solar normal, dicha degradación no se produce hasta pasados 20-30 minutos. En la recolección de orina de 24 horas obviábamos este inconveniente guardando el producto en botellas de cristal tapadas, en el frigorífico, al amparo de la luz y del calor; en estas condiciones la degradación no tenía lugar hasta pasadas de 36 a 48 horas.

1ª Etapa. Formación de los azopigmentos. A un ml. de la muestra a analizar (plasma, orina) se le añade medio ml. de ácido sulfanílico diazotizado, agitando suavemente la mezcla. Después de cinco minutos se detiene la reacción agregando 0,2 ml. de azida sódica. En el tubo control la reacción no se produce, porque agregamos la azida sódica a la muestra antes que el ácido sulfanílico diazotizado. Así, en el tubo problema quedan formados los azopigmentos A y B, mientras que en el tubo control dichos azopigmentos no se forman. A continuación se agrega 0,5 ml. de buffer glicina pH-2a ambos tubos, problema y control.

2ª Etapa. Extracción de los azopigmentos. Seguidamente se añade a ambos tubos 8 ml. de n-butanol, se tapan con tapon de goma y se agitan manualmente durante 3 minutos. A continuación se centrifugan a 3,500 revoluciones /mi. durante tres minutos. La capa superior de n-butanol así formada contiene el 100% de azopigmento A y el 70% de azopigmento B.

3ª Etapa. Separación de los azopigmentos. Una vez centrifugados los tubos, tomamos la capa superior entera y adicionamos 8 ml. de cloroformo y 3 ml. de buffer acetato pH-3. Se vuelven a tapar los tubos y se agitan durante dos minutos, centrifugados a continuación a 2.000revol./mi. durante cinco minutos. De esta manera se forman dos capas: la superior, de buffer acetato, que contiene el 98% aproximadamente de azopigmento B; y la inferior, de n-butanol-cloroformo, que contiene el 89% de azopigmento A. Se toman ambas capas del tubo problema y se miden contra las correspondientes del tubo control en un fotocolorímetro Beckman, a una longitud de onda de 540  $\mu$ m. La capa inferior, de n-butanol-cloroformo, suele aparecer con cierta turbidez, por lo que debe calentarse ligeramente, al baño María, antes de la lectura, desapareciendo dicha turbidez.

d) Curva de calibración.-

Hemos utilizado la misma elaborada por Díaz Rubio (Jr.) (43), preparada siguiendo a Schachter: diferentes concentraciones de azopigmento A y B

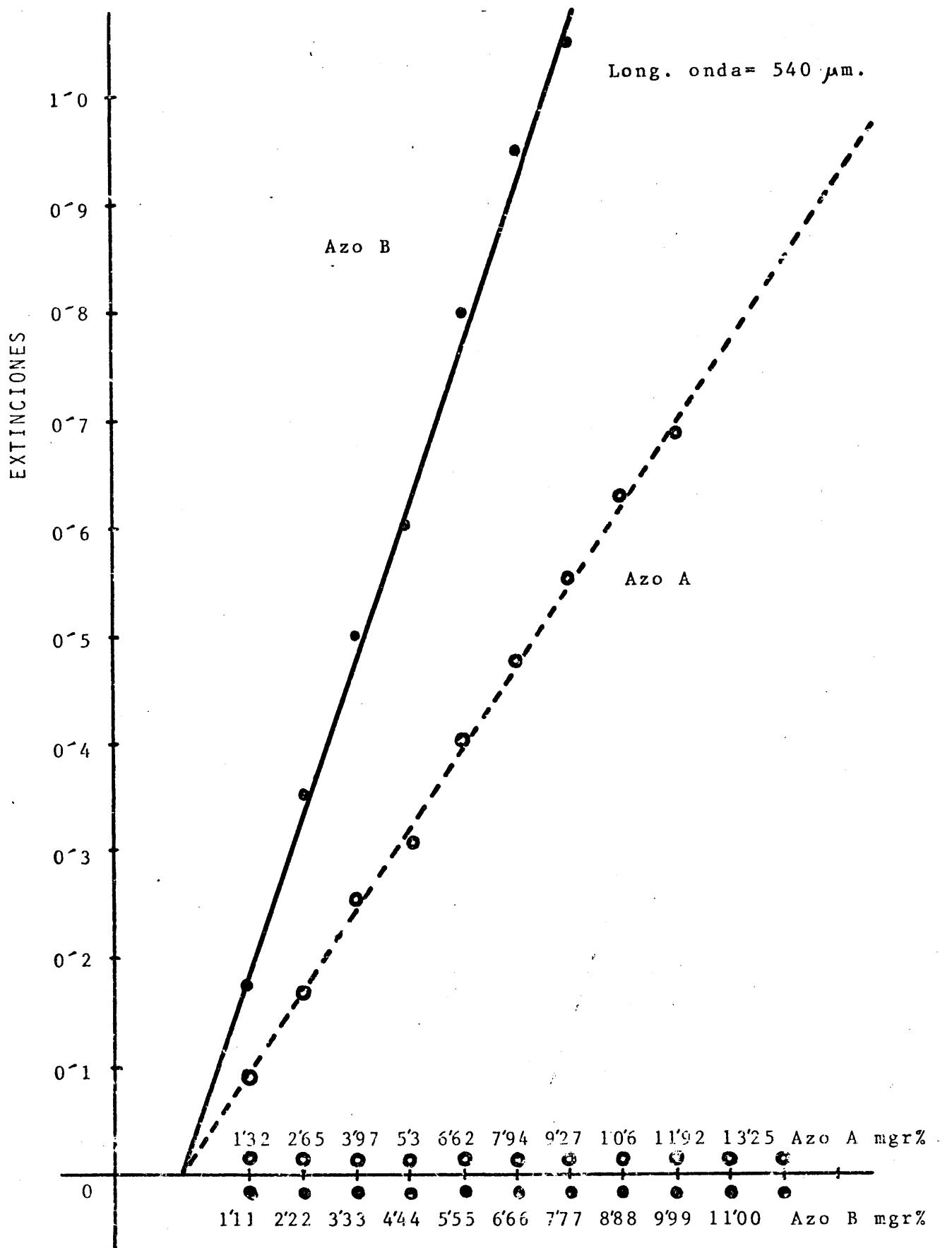


FIG. 10

CURVA DE CALIBRACION. (Diaz-Rubio)

en soluciones de buffer actato y n-butanol-cloroformo, son medidas a la longitud de onda de 540  $\mu$ m. y trasladados los resultados a una gráfica como la representada en la figura 13. Las extinciones obtenidas en el fotocolorímetro están representadas en las ordenadas y las correspondientes concentraciones de azopigmentos, en mgr%, en las abscisas.

e) Cálculo de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina.-

Para calcular el porcentaje de bilirrubina monoglucuronizada existente en las muestras se ha aplicado la fórmula propuesta por Mc Gill (134):

$$M = \frac{2 A}{A + B} \cdot 100$$

En donde M es el tanto por ciento de bilirrubina monoglucuronizada.

A, es la concentración de azopigmento A, expresada en mgr%; B, la concentración de azopigmento B, en mgr%

La razón de esta fórmula es la siguiente:

Bm=Pigmento B derivado del pigmento I monoconjugado.

Bd=Pigmento B derivado del pigmento II diconjugado.

En cantidades molares:

1 mol de Pigmento I = 1 mol de Pigmento A = 1 mol de Pigmento Bm

1 mol de Pigmento II = 1/2 mol de Pigmento Bd

Porcentaje de pigmentos conjugados comprendidos en el Pigmento II:

$$\text{Pigmento I} = \frac{A}{(A + 1/2 \text{ Bd})}$$

$$\text{Bd} = \text{B total} - \text{Bm} ; \text{Bm} = A.$$

$$M = \frac{A}{A + 1/2 (\text{B total} - A)} = \frac{2 A}{A+B}$$

Los restantes parámetros utilizados (pH en sangre y orina; densidad y albúmina en orina; albúmina, gamma-globulina, protrombina, bromo, GOT, GPT, LAP y fosfatasa alcalinas en sangre; aclaramiento de creatinina, etc.) han sido determinados, por las técnicas habituales en el Laboratorio Central del Hospital Clínico de San Carlos ; en el Laboratorio de Gases del Departamento Central de Ex-

ploración Cardiopulmonar del mismo hospital.

C) Cálculos estadísticos.-

Para los cálculos estadísticos de los resultados obtenidos hemos aplicado las fórmulas siguientes, si bien las operaciones han sido realizadas, a través del Departamento Central de Informática Médica del Hospital Clínico de San Carlos (Dr. Martín Cinto y licenciado en Matemáticas Sr. Rodríguez Artalejo), en el Centro de Cálculo de la Ciudad Universitaria de Madrid:

1.- Media aritmética o promedio:

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

donde:

$\bar{X}$  = media aritmética

S = sigma o suma de todos los valores del parámetro de la muestra

n = número de casos de la muestra

$x_i$  = valor del parámetro determinado en el enfermo i.

2.- Desviación típica o standard:

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

donde: S.D. = desviación standar o "standard desviación"

La significación de las retantes letras corresponden con la del apartado anterior:

3.- Error típico o standard:

$$ET = \frac{S.D.}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left( \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2 \right)}$$

donde: ET. = error típico

4.- Coefficiente de variación.-

$$O. V. = \frac{S.D. \ 100}{\bar{X}}$$

donde:

C.V. = coeficiente de variación

S.D. = desviación standar

$\bar{X}$  . = media aritmética

5.- Coefficiente de correlación.-

$$r = \frac{\left| \sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)(\sum_{i=1}^n y_i)}{n} \right|}{\sqrt{\left( \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n} \right) \left( \sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n} \right)}}$$

donde

r = coeficiente de correlación

$x_i$  = valor de un parámetro en el enfermo i

$y_i$  = valor de otro parámetro (a comparar) en el mismo enfermo

S = sigma o suma de todos los valores de los parámetros de la muestra

n = número de casos de la muestra

Este coeficiente varia de 0 a 1. Cuanto más próximo a la unidad sea el valor obtenido, mejor correlación (asociación) existirá entre los parámetros. Valores de 0,8 a 1 se dan como buenos (buena correlación). De 0,6 a 0,8, escasa correlación. Menor de 0,6, mala correlación. Si son positivos, la correlación es directa. Si son negativos, correlación inversa.

6.- Grados de libertad.-

$$G.L. = n_1 + n_2 - 2$$

donde:

G.L. = grados de libertad

$n_1$  = número de los casos del primer grupo a comparar

$n_2$  = número de casos del segundo grupo a comparar

(Con este dato y el siguiente, coeficiente de la t de Student, calcularemos la probabilidad).



7.- Coeficiente de la t (de Student):

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{(n_1 + n_2 - 2) n_1 \cdot n_2}{(n_1 + n_2) (n_1 SD_1^2 + n_2 SD_2^2)}}$$

donde:

t= coeficiente de la t de Student

$\bar{X}_1$ = media aritmética del parámetro a comparar, en el grupo I

$\bar{X}_2$ = media aritmética del parámetro a comparar, en el grupo II

$n_1$ = número de casos del grupo I

$n_2$ = número de casos del grupo II

$SD_1$ = desviación estándar del parámetro a comparar, en el grupo I.

$SD_2$ = desviación estándar del parámetro a comparar, en el grupo II.

8.- Probabilidad:

La calculamos a partir de los datos 6 y 7, buscando su valor en las tablas científicas Geigy (135).

En nuestro trabajo la designaremos con la letra p y la consideraremos estadísticamente significativa cuando su valor sea menor de 0,05.

Todas las fórmulas expuestas han sido tomadas de Bancroft (136), con las que han sido programadas las computadoras del Centro de Cálculo de la Universidad de Madrid.



Tabla I

GRUPO N.- NORMALES				
Caso	Nombre	Edad	Sexo	DIAGNOSTICO
1	J. C. M.	34	V	Normal
2	A. G. L.	24	H	"
3	E. C. M.	35	V	"
4	J. M. L.	71	H	Artrosis renal
5	J. G. H.	61	V	Normal
6	F. S. D.	60	H	"
7	A. O. M.	35	V	"
8	M. G. H	36	V	"
9	M. G. S.	28	V	"
10	C. V. M.	22	H	"
11	R. V. B.	33	V	"
12	R. L.	30	H	Poliomielitis (secuelas)
13	F. C. M.	44	V	Normal
14	A. A. C.	40	H	"

Tabla II

GRUPO A.- ICTERICIAS POR HEMOLISIS				
Caso	Nombre	Edad	Sexo	DIAGNOSTICO
16	B. C. C.	49	H	Microesferocitosis. Hepatitis aguda pos-transfusional
23	A. C. D.	34	V	Policitemia vera
53	A. R. R.	17	H	Anemia hemolitica autoimmune
59	A. R. R.	17	H	Anemia hemolitica. Colestasis
63	A. R. R.	17	H	Anemia hemolitica. (Intervenida)
64	A. R. R.	17	H	Anemia hemolitica. (Intervenida)

Tabla III

G R U P O B.- SUBGRUPO "a".-HEPATOPATIAS DIFUSAS AGUDAS				
Caso	Nombre	Edad	Sexo	<u>D I A G N O S T I C O</u>
16	B. C. C.	49	H	Microesferocitosis. Hepatitis aguda pos-transfusional.
20	P. N. R.	40	W	Hepatitis aguda viral
29	G. S. M.	34	H	" " "
38	S. G. Y.	21	W	" " "
42	N. H. F.	38	H	" " "
44	A. C. L.	33	H	Hepatitis aguda viral. Fiebre de Malta
49	J. P. G.	27	W	Hepatitis aguda viral
57	M. C. M.	42	W	" " "
58	L. F. T.	48	H	" " "

Table IV

G R U P O B.- SUBGRUPO "b".-HEPATOPATIAS DIFUSAS CRONICAS				
Caso	Nombre	Edad	Sexo	<u>D I A G N O S T I C O</u>
21	M. T. G.	67	V	Hepatitis crónica agresiva
40	C. P. C.	17	H	" " "
61	J. C. G.	72	V	" " "
24	A. C. V.	52	H	Cirrosis hepática postnecrótica
30	N. S. P.	38	H	" " "
41	M. M. G.	47	V	" " "
48	G. G. G.	62	V	" " "
52	G. G. G.	62	V	" " "
60	F. B. L.	72	V	" " "
62	F. A. G.	47	V	" " "
25	A. V. E.	57	V	Cirrosis hepática septal
26	A. V. E.	57	V	" " "
34	J. R. G.	64	V	" " "
43	C. N. M.	67	H	" " "
27	M. D. C.	58	V	Síndrome de Gilbert
31	D. S. P.	65	V	Síndrome de Rotor

Tabla V

G R U P O B.-SUBGRUPO "c".-HEPATOPATIAS TUMORALES				
Caso	Nombre	Edad	Sexo	<u>D I A G N O S T I C O</u>
22	V. E. A.	47	V	Metástasis hepáticas por carcinoma de pulmón
35	P. M. M.	7	V	Carcinoma hepático (¿Angiosarcoma?)
54	A. R. M.	47	H	Hepatoma sobre Cirrosis hepática post-hepática
56	A. R. M.	47	H	" " " " "

Tabla VI

GRUPO C. - <u>ICTERICIAS OBSTRUCTIVAS</u>				
CASO	Nombre	Edad	Sexo	<u>DIAGNOSTICO</u>
15	S. S. S.	49	H	Quiste hidatídico hepático
17	C. G. R.		H	Litiasis biliar
19	M. C. C.	80	H	" "
33	D. C. S.	62	H	" "
39	R. M. S.	53	H	" "
50	M. A. J.	37	H	" "
18	D. B. B.	58	V	Neoplasia distal de vías biliares
28	G. P. C.	74	H	Carcinoma de vesícula
45	F. G. M.	65	H	Probable neoplasia distal de vías biliares
37	C. G. B.	59	H	Carcinoma de cabeza de páncreas
46	F. F.	60	V	" " "
32	A. E. V.	21	H	Colecistitis aguda
36	N. D. R.	59	V	" "
66	A. R. S.	56	H	" "
51	A. G. G.	48	"	Colecistitis crónica
55	C. M. C.	56	H	Síndrome postcolecistectomía
59	A. R. R.	17	H	Colestasis extrahepática funcional. Anemia hemolítica autoinmune
63	A. R. R.	17	H	Colestasis extrahepática (intervenida)
64	A. R. R.	17	H	" " "
65	J. C. R.	47	V	Colangitis postcolecistectomía

## RESULTADOS

## R E S U L T A D O S

Todos los casos estudiados, como ya dijimos, los dividimos en cuatro grupos, correspondiendo el primero a los normales, que nos sirvieron de grupo control, y los tres grupos restantes a los enfermos con ictericia, clasificados, según diversos autores (27,42,85) de acuerdo con la etiopatogenia de la misma. Así, un grupo de ictericias por hemólisis (grupo A); un segundo grupo de ictericias por hepatopatía (grupo B), subdividido a su vez en "hepatopatías difusas agudas" (subgrupo "a"), "hepatopatías difusas crónicas" (subgrupo "b") y "hepatopatías tumorales" (subgrupo "c"); un tercer grupo de ictericias por obstrucción de vías biliares (grupo C): Todos los datos referentes a los mismos están recogidos en las tablas del I al VI, del capítulo anterior.

Para una mejor ordenación de los resultados, comenzaremos por exponer los obtenidos en el grupo de los normales.



#### Grupo N. Normales.-

Está constituido por catorce sujetos en los cuales se descartó cualquier enfermedad hemolítica, hepatopatía o de vías biliares, actual o pasada, o cualquier otro proceso que pudiera tener influencia directa o indirecta sobre el metabolismo de los pigmentos biliares.

En las tablas VII, VIII y IX están recogidos los valores de los parámetros determinados o calculados, así como los datos estadísticos correspondientes (media aritmética, desviación standard, error típico y coeficiente de variación).

#### Resultados.-

Como podemos ver en la tabla VII, hay un franco predominio en sangre de la bilirrubina monoglucuronizada sobre la diglucuronizada, con un promedio de la primera de 91,5% y una desviación standard de  $\pm 2,79$ . En orina, por el contrario, predomina la bilirrubina diconjugada, con un promedio de 62,71% y una desviación standard de  $\pm 11,98$ . Esto se explica, como ya expusimos en capítulos anteriores, por una mayor solubilización del pigmento diconjugado, lo que facilita su eliminación renal.

Observamos también un predominio en sangre de la bilirrubina indirecta (0,68 mgr%  $\pm 0,19$ ) sobre la directa (0,27  $\pm 0,10$ ) y lo contrario en orina, donde la bilirrubina directa (0,28 mgr%  $\pm 0,08$ ) predomina sobre la indirecta (0,17  $\pm 0,06$ ). Queremos comentar a este respecto, y será más evidente cuando analicemos el grupo de las ictericias, que aún cuando la bilirrubina indirecta es prácticamente insoluble en medio acuoso, como ya referimos en otro apartado, se la encuentra en orina, si bien en cantidades exiguas, no siendo tan excepcional su presencia en ella, como comentan muchos autores.

Respecto a los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, observamos así mismo un franco predominio de la diconjugada (9,55 c.c./m  $\pm 8,77$ ) sobre la monoconjugada (0,43 c.c./mi  $\pm 0,19$ ), de acuerdo con la mayoría de los autores.

Correlaciones.- Quisimos ver si existía alguna correlación de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, aclaramiento de las mismas y bilirrubina directa e indirecta con algunos otros parámetros determinados (pH en sangre y orina, volumen minuto de orina, aclaramiento de creatinina, etc.). En la tabla X hemos expuesto algunos de ellos, pudiendo deducir ciertas conclusiones:

a.- Ni la bilirrubina total, directa ni indirecta en orina guardan ninguna relación con las correspondientes tasas de las mismas en sangre: coeficientes de correlación 0,489, 0,928 y 0,443, respectivamente.

b.- Tampoco dichas tasas en orina mantienen correlación alguna ni con el pH de la sangre ( $r=0,118$ ,  $0,139$  y  $0,075$ , respectivamente) ni con el de la orina ( $r=0,319$ ,  $0,281$  y  $0,505$ ).

c.- Respecto a las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, y aunque, como dijimos, existe un franco predominio de la diconjugada en orina, tampoco encontramos correlación entre las tasas de las mismas en sangre y orina:  $r=0,218$  en ambos casos.

d.- De los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, solo encontramos escasa correlación del aclaramiento de la diconjugada con el pH del medio, tanto de la sangre como de la orina ( $r=0,655$  en ambos casos) (figs. 14 y 15). No hubo correlación del aclaramiento de la monoconjugada, ni con el pH de la sangre ( $r=0,331$ ) ni con el de la orina ( $r=0,297$ ).

e.- Tampoco hubo correlación entre los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina y el aclaramiento de creatinina ( $r=0,092$  y  $0,190$ , respectivamente para la mono y la di).

f.- Finalmente, la correlación de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina también fué nula respecto a otros parámetros: densidad de orina ( $0,179$  y  $0,362$ ), volumen minuto ( $0,490$  y  $0,256$ ), bilirrubina directa en sangre ( $0,507$  y  $0,548$ ) etc. Solamente hubo escasa correlación entre el aclaramiento de bilirrubina diglucuronizada y la tasa de la misma en sangre ( $r=0,678$ ).

#### Conclusiones de los resultados en el grupo de los normales.-

1.- Encontramos franco predominio de la fracción monoconjugada en sangre y de la diconjugada en orina.

2.- Igualmente, noto predominio del aclaramiento de la diconjugada en relación a la monoconjugada.

3.- Evidente predominio de las tasas de bilirrubina directa en orina, respecto a la bilirrubina indirecta en la misma.

4.- Escasa correlación de la diconjugada en sangre respecto a su aclaramiento, así como de ésta con el pH de la sangre y orina (figs. 14, 15).

5.- Nula correlación de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, así como de sus aclaramientos y de las tasas de bilirrubina directa e indirecta en sangre, en relación a los restantes parámetros determinados: pH en sangre y orina, densidad de la orina, volumen minuto, aclaramiento de creatinina, etc. (tabla X).

En la discusión de los resultados, comentaremos algunos aspectos de las conclusiones aquí referidas.

Tabla VII

GRUPO N. - <u>NORMALES</u>						
Determinaciones en <u>Sangre</u>						
Caso	Mono	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH
1	91	9	0,75	0,20	0,55	7,31
2	89	11	0,55	0,15	0,40	7,37
3	88	12	0,84	0,24	0,60	7,40
4	92	8	0,90	0,27	0,63	7,38
5	90	10	1,15	0,30	0,85	7,36
6	94	6	0,90	0,20	0,70	7,34
7	93	7	1,15	0,25	0,90	7,34
8	97	3	1,25	0,15	1,10	7,30
9	92	8	1,03	0,28	0,75	7,35
10	93	7	0,80	0,40	0,40	7,42
11	89	11	1,00	0,30	0,70	7,39
12	95	5	1,00	0,40	0,60	7,33
13	91	9	1,03	0,20	0,83	7,35
14	87	13	1,04	0,50	0,54	7,38
$\bar{X}$	91,50	8,50	0,95	0,27	0,68	7,35
S.D.	2,79	2,79	0,18	0,10	0,19	0,03
E.T.	0,74	0,74	0,04	0,02	0,05	0,009
C.V.	3,05	32,87	19,12	36,89	28,47	0,46

Tabla VIII

GRUPO N.- NORMALES									
Determinaciones en Orina									
Caso	Mono	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH	Dens.	Alb.	Vol/mi
1	34	66	0,30	0,20	0,10	5,4	1018	(-)	1,01
2	40	60	0,37	0,22	0,15	7,0	1020	(-)	1,04
3	35	65	0,25	0,15	0,10	6,5	1015	(-)	0,83
4	49	51	0,80	0,30	0,20	6,0	1022	indicios	1,01
5	49	51	0,45	0,35	0,10	6,0	1020	(-)	1,12
6	20	80	0,48	0,30	0,18	6,5	1015	(-)	0,94
7	30	70	0,70	0,40	0,30	7,0	1018	(-)	0,98
8	42	58	0,45	0,25	0,20	8,0	1016	(-)	1,10
9	47	53	0,43	0,27	0,16	6,0	1018	(-)	0,98
10	52	48	0,37	0,22	0,15	5,5	1020	(-)	1,00
11	39	61	0,52	0,32	0,20	7,0	1020	(-)	0,89
12	48	52	0,35	0,25	0,10	6,5	1025	(-)	0,74
13	13	87	0,80	0,50	0,30	7,0	1016	(-)	0,86
14	24	76	0,50	0,30	0,20	6,5	1015	(-)	1,20
X	37,28	62,71	0,46	0,28	0,17	6,45	1018	0,0	0,97
S.D.	11,98	11,98	0,14	0,06	0,06	0,65	2,95	0,0	0,12
E.T.	3,20	3,20	0,03	0,02	0,01	0,18	0,76	0,0	0,03
C.V.	32,14	19,10	31,72	30,77	38,24	10,64	0,29	0,0	12,43

Tabla IX

GRUPO N. - NORMALES				
Caso	Aclar. de Mono	Aclar. de Di	Cociente $\frac{Di}{Mono}$	Aclar. Creat.
1	0,39	7,29	18,69	87,00
2	0,64	8,45	13,20	24,20
3	0,19	2,87	15,10	83,00
4	0,60	6,35	10,58	112,00
5	0,70	6,66	9,52	91,00
6	0,31	18,75	59,8	67,00
7	0,51	15,88	31,14	74,00
8	0,79	35,55	45,00	89,00
9	0,48	6,36	13,25	73,00
10	0,31	3,75	12,09	77,20
11	0,41	3,90	9,51	84,00
12	0,23	4,50	19,56	123,00
13	0,28	9,37	34,70	93,00
14	0,19	4,15	21,86	82,00
$\bar{X}$	0,431	9,559	22,477	87,814
S.D.	0,195	0,776	15,217	15,014
E.T.	0,052	2,345	4,067	4,013
C.V.	45,208	91,780	67,700	17,098

Tabla X

GRUPO N.- NORMALES											
COEFICIENTES DE CORRELACION											
	MO-S	DI-S	BT-S	BD-S	BI-S	pH-S	pH-O	VOL/M	C <sub>m</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>C</sub>
MO-O	0,218										0,359
DI-O		0,218	0,074	0,036	0,116	0,196					0,359
BT-O			0,489			0,118	0,399				
BD-O				0,028		0,139	0,281				0,029
BI-O					0,443	0,075	0,505				0,224
DEN-O											
C <sub>m</sub>				0,507		0,331	0,297	0,490			
C <sub>D</sub>		0,678		0,548		0,655	0,655	0,256			
C <sub>C</sub>						0,122			0,092	0,190	
ALBU.									X	X	
G-GLO									X	X	
PROT									X	X	
B.S.P.									X	X	
GOT									X	X	
GPT									X	X	
F-ALC									X	X	
L.A.P.									X	X	

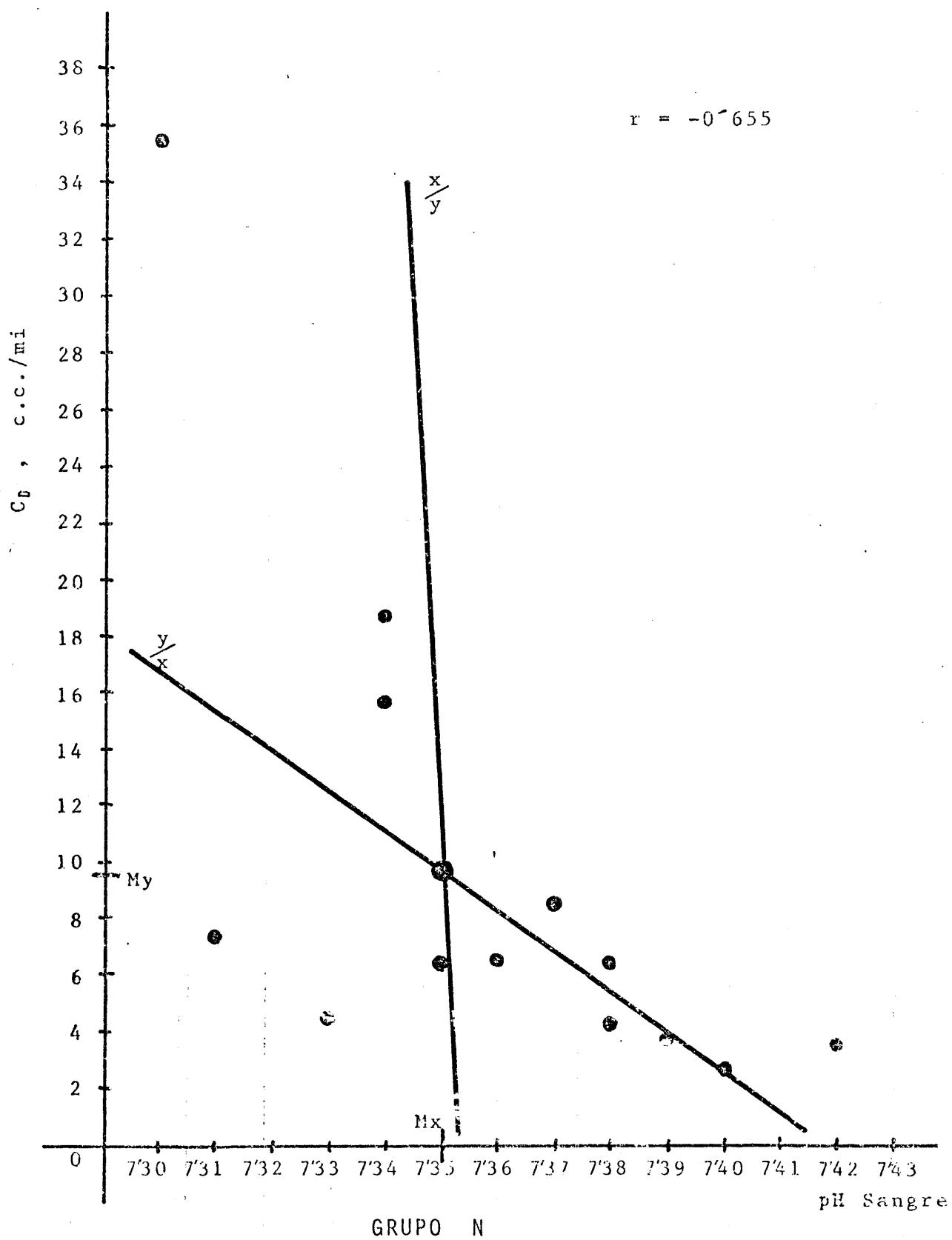
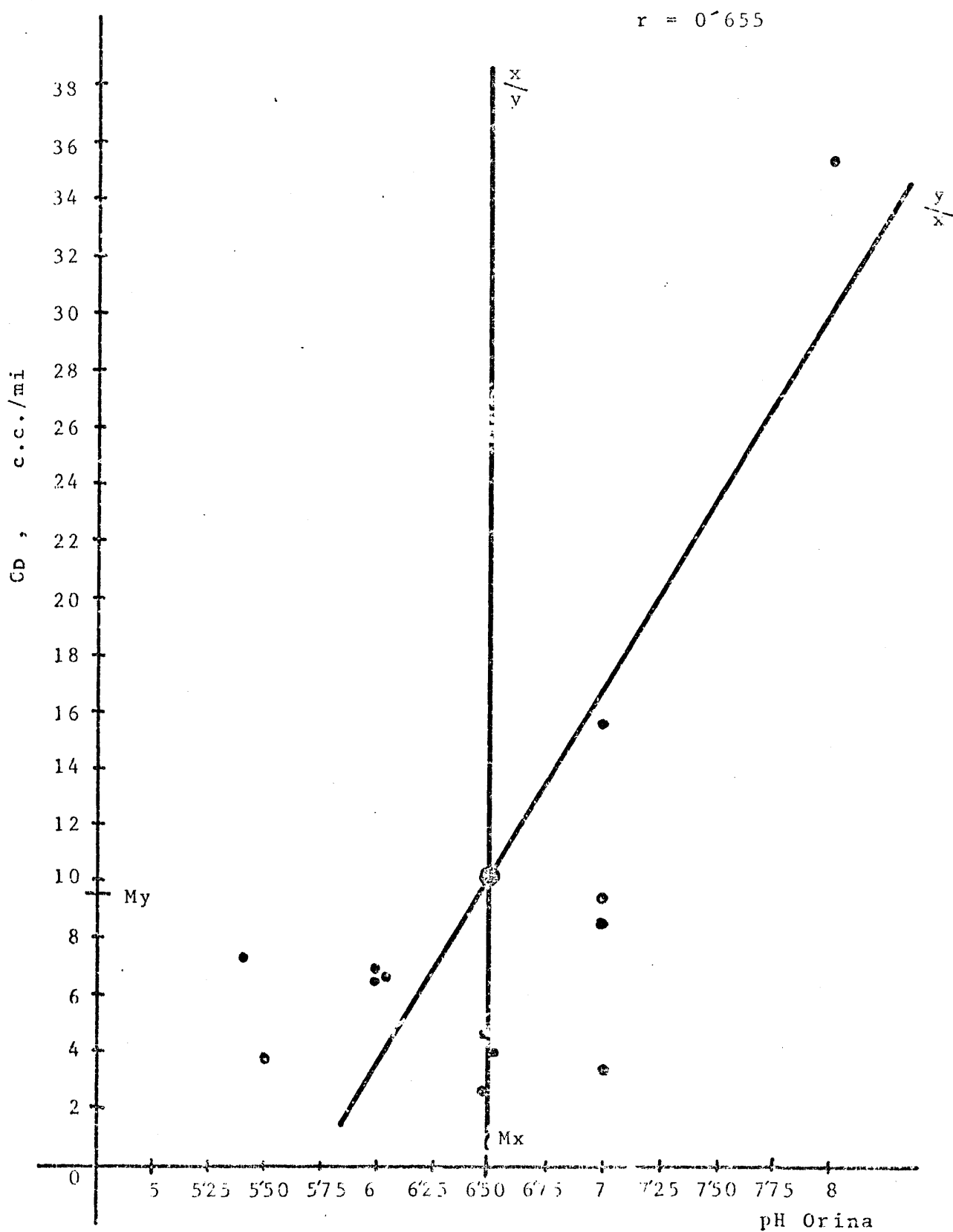


FIG. 14

CORRELACION ENTRE pH SANGRE Y ACLARAMIENTO DE Di (CD)





GRUPO N

FIG. 15

CORRELACION ENTRE pH ORINA Y CLARIFICADO DE DI (CD)

Grupo A. Ictericias por hemólisis.-

Este grupo está constituido por seis determinaciones en tres enfermos. El primero, enferma portadora de una microesferocitosis con marcada anemia hemolítica que posteriormente contrajo una hepatitis aguda postransfusional, momento en que llegó a nosotros y realizamos las determinaciones. El segundo caso, se trataba de un enfermo con moderada ictericia en el seno de una policitemia vera, con evidente predominio de la bilirrubina indirecta en sangre, vida media de los hematíes acortada y pruebas de laboratorio positivas de hemólisis. El tercer caso, A.R.R., hembra de 17 años, con anemia hemolítica autoinmune, que posteriormente hizo una intensa colestasis; realizamos en ella cuatro determinaciones, antes, durante y después de ceder la colestasis tras la intervención quirúrgica a que fué sometida, determinandose la causa de aquélla, debida a intenso espesamiento de la bilis en las vías biliares extrahepáticas, no encontrandose ninguna otra causa mecánica (litiasis, tumor, etc.) que la produjera; fué esplenectomizada.

En las tablas XI, XII y XIII se recogen los valores de los parámetros determinados o calculados, así como los correspondientes datos estadísticos.

Resultados.-

Como podemos ver en la tabla XI, también en este grupo hubo un franco predominio de la bilirrubina monoglucuronizada en sangre, con un promedio de 83,66 y una desviación standard de  $\pm 20,11$ . Por el contrario, en orina predominó la bilirrubina diglucuronizada, con un promedio de 70,33% y una desviación standard de  $\pm 19,43$ . En ninguno de los casos esta desviación de los promedios con los normales tuvo significación estadística ( $p > 0,3$  por las fracciones en sangre, y  $p > 0,2$  por las fracciones en orina).

La bilirrubina directa predominó en sangre ( $10,68 \pm 14,35$ ), debido a la elevada tasa de bilirrubina total así como de directa, en dos de los casos (14,70 y 39,24 mg% de directa), si bien las tasas de bilirrubina indirecta fueron, así mismo, muy elevadas en relación a la total (7,81 y 18,76 mgs% de bilirrubina indirecta, respectivamente). En orina como era de esperar, predominó la bilirrubina directa ( $8,72 \pm 16,09$ ) sobre la indirecta ( $1,42 \pm 1,35$ ).

En relación a los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, hubo un franco predominio de la forma diconjugada (4,72 c.c./mi, con una SD de  $\pm 5,63$ ) frente a la monoglucuronizada (0,22 c.c./mi  $\pm 0,18$ ). El primero sin

significación estadística respecto a los normales ( $p > 0,2$ ); el aclaramiento de la mono, respecto a los normales, tuvo disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

El cociente entre el aclaramiento de la diconjugada y la monoconjugada arrojó un promedio de 140,36, siendo el más alto registrado en todas las series de enfermos, como veremos más adelante, si bien no tiene significación estadística, comparado con el total de enfermos ( $p > 0,4$ ) ni con los restantes grupos por separado ("a":  $p > 0,9$ ; "b":  $p > 0,3$ ; "c":  $p > 0,4$ ; C:  $p > 0,4$ ).

Los resultados de otros parámetros determinados en sangre (bromo, protrombina, albúmina,  $\alpha$ -globulina, transaminasas, etc.) están representados en la tabla XIV, de los que más adelante indicaremos posible existencia de correlación de los mismos con las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina y sus aclaramientos.

Correlaciones.— Algunos de los coeficientes de correlación, con diversos parámetros, en este grupo de ictericias hemolíticas, están reflejados en la tabla XV y los comentaremos someramente:

En primer lugar, las tasas tanto de bilirrubina total, como de directa o indirecta en orina tuvieron una excelente y directa correlación con las correspondientes tasas de las mismas en sangre ( $r=0,952$ ,  $0,953$  y  $0,940$  respectivamente), como podemos también apreciar en la fig. 16 para la bilirrubina directa en ambos medios (sangre y orina), así como en la fig. 17 para la bilirrubina indirecta en los referidos humores.

Existió también buena correlación entre el pH de la sangre y la tasa de bilirrubina directa en orina ( $r=0,849$ ), así como para la bilirrubina indirecta en orina ( $r=0,850$ ). Estas correlaciones están representadas en las figuras 18 y 19. Por el contrario, no hubo buena correlación entre el pH de la orina y la tasa de bilirrubina directa en orina ( $r=0,048$ ), así como con la tasa de bilirrubina indirecta en el mismo medio ( $r=0,082$ ).

Tampoco hubo correlación de las tasas de bilirrubina directa ( $r=0,366$ ) e indirecta ( $r=0,445$ ) en orina respecto al volumen minuto de la misma.

En relación a las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, no hubo correlación entre las tasas de éstas en sangre y las correspondientes en orina ( $r=0,351$ ).

Los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina se comportaron de la siguiente manera respecto a los restantes parámetros:

1) Hubo escasa correlación del aclaramiento de la monoconjugada con el pH de la sangre ( $r=0,633$ ) y ninguna correlación de la diconjugada con el mismo parámetro ( $r=0,358$ ).

2) Por el contrario, hubo escasa correlación del aclaramiento de la diconjugada con el pH de la orina ( $r=0,733$ ) y ninguna correlación de la monoconjugada con el mismo parámetro.

3) No hubo ninguna relación entre los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina y volumen minuto de orina, ni para la forma monoconjugada ( $r=0,213$ ) ni para la diconjugada ( $r=0,535$ ).

4) Tampoco hubo correlación entre el aclaramiento de las fracciones mono y diglucuronizadas de la bilirrubina y el aclaramiento de creatinina ( $r=0,558$  y  $0,429$ , respectivamente). Fig. 20.

5) Los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina no guardaron relación con las tasas de dichas fracciones en sangre ( $r=0,401$  y  $0,446$ , respectivamente).

6) Los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas se correlacionan aceptablemente con la densidad de orina ( $r=0,801$  y  $0,775$ ).

7) Finalmente, no hubo buena correlación de los aclaramientos renales de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina con los siguientes parámetros en sangre: gamma-globulina ( $0,290$  y  $0,522$ ), protrombina ( $0,410$  y  $0,176$ ), GOT ( $0,273$  y  $0,426$ ), GPT ( $0,006$  y  $0,513$ ), fosfatas alcalinas ( $0,049$  y  $0,050$ ). Con la bromo y L.A.P. hubo "falsa ideal correlación" ( $r=1$ ), pero no tiene valor alguno por cuanto dichos parámetros solo se determinaron dos veces, y era obligada esta aparente correlación ya que por dos puntos solo pasa una línea recta. Es decir, resumiendo, no se correlacionaron los aclaramientos ni con el estado de la función hepática ni con el grado de colestasis. Solo el aclaramiento de la bilirrubina diglucuronizada se correlacionó bien con la tasa de albúmina plasmática ( $r=0,950$ , siendo esta correlación de tipo inverso (Fig. 21).

#### Conclusiones de los resultados en el grupo de las ictericias por hemolisis.

1) Encontramos evidente predominio de la fracción monoglucuronizada en orina, sin significación estadística respecto a los normales.

2) Igualmente, obtuvimos predominio del aclaramiento de la fracción diconjugada respecto al correspondiente aclaramiento de la monoconjugada, éste último, con disminución estadísticamente significativa respecto a los normales.

3) Así mismo, preponderancia de las tasas de bilirrubina directa en orina frente a las respectivas tasas de bilirrubina indirecta en dicho medio.

4) Excelente y directa correlación entre las tasas de bilirrubina directa e indirecta en sangre y las correspondientes tasas de las mismas en orina.

5) Buena correlación de las tasas de bilirrubina directa e indirecta en orina con el pH de la sangre, siendo esta correlación de tipo directo.

6) Por el contrario, mala correlación de dichos parámetros en orina en relación al pH de la misma.

7) No hubo correlación de las tasas de bilirrubina directa e indirecta en orina con el volumen minuto de la orina.

8) Tampoco existió correlación entre las tasas de las fracciones glucuronizadas en la orina y las correspondientes tasas en sangre.

9) El pH de la sangre se correlacionó escasamente con el aclaramiento de la bilirrubina monoglucuronizada y no hubo correlación con la diglucuronizada.

10) Por el contrario, el pH de la orina se correlacionó escasamente con el aclaramiento de la bilirrubina diglucuronizada y nada con la monoglucuronizada.

11) No hubo correlación entre los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas y el aclaramiento de creatinina.

12) Tampoco hubo correlación entre los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas y el volumen minuto de orina.

13) Los aclaramientos no se correlacionaron con las tasas en sangre de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina.

14) Los aclaramientos de dichas fracciones glucuronizadas de la bilirrubina no se correlacionaron ni con el estado de la función hepática ni con el grado de colestasis.

15) Solo hubo buena correlación del aclaramiento de la bilirrubina diglucuronizada con la tasa de albúmina plasmática, siendo esta correlación de tipo inverso.

Tabla XI

GRUPO A.- <u>ICTERICIAS HEMOLITICAS</u>						
Determinaciones en <u>Sangre</u>						
Caso	Mono	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH
16	73	27	22,51	14,70	7,81	
23	94	6	2,63	0,62	2,01	
53	97	3	4,85	2,15	2,70	7,41
59	47	53	57,00	39,24	18,76	7,52
63	96	4	7,69	4,30	3,39	7,43
64	95	5	4,45	3,10	1,35	7,47
$\bar{X}$	83,66	16,33	16,52	10,68	6,00	7,45
S.D.	20,11	20,11	21,10	14,85	6,65	0,04
E.T.	8,21	8,21	8,61	6,06	2,71	0,02
C.V.	24,04	123,16	127,74	139,06	110,82	0,65

Table XII

GRUPO A.- <u>ICTERICIAS HEMOLITICAS</u>									
Determinaciones en Orina									
Caso	Mono	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH	Dens.	Alb.	Vol./ml
16	12	88	4,10	3,10	1,00	6,0	1024		1,02
23	51	49	1,10	0,80	0,30	6,8	1014		0,58
53	42	58	2,65	1,65	1,00	5,2	1021		0,84
59	23	77	45,50	41,50	4,10	6,0	1015	(-)	0,90
63	4	96	5,20	3,85	1,35	7,0	1040	(-)	0,72
64	46	54	2,25	1,45	0,80	5,6	1021	(-)	0,69
- X	29,65	70,33	10,25	8,72	1,42	6,10	1022	0,0	0,79
S.D.	19,43	19,43	17,42	16,09	1,35	0,69	9,77	0,0	0,15
E.T.	7,93	7,93	7,11	6,57	0,55	0,28	3,98	0,0	0,06
C.V.	65,52	27,53	171,68	184,48	95,08	11,31	0,95	777,00	20,09

Table XIII

GRUPO A.- ICTERICIAS HEMOLITICAS				
Caso	Aclar. de Mono	Aclar. de Di	Cociente $\frac{Di}{Mono}$	Aclar. Creat.
16	0,030	0,660	22,00	52,50
23	0,400	6,100	15,25	84,00
53	0,270	1,240	4,59	153,00
59	0,460	1,370	2,97	90,00
63	0,020	15,480	774,00	43,20
64	0,150	3,510	23,40	39,67
$\bar{X}$	0,222	4,727	140,368	77,062
S.D.	0,186	5,368	310,532	42,732
E.T.	0,076	2,302	126,774	17,445
C.V.	0,032	119,291	221,226	55,452

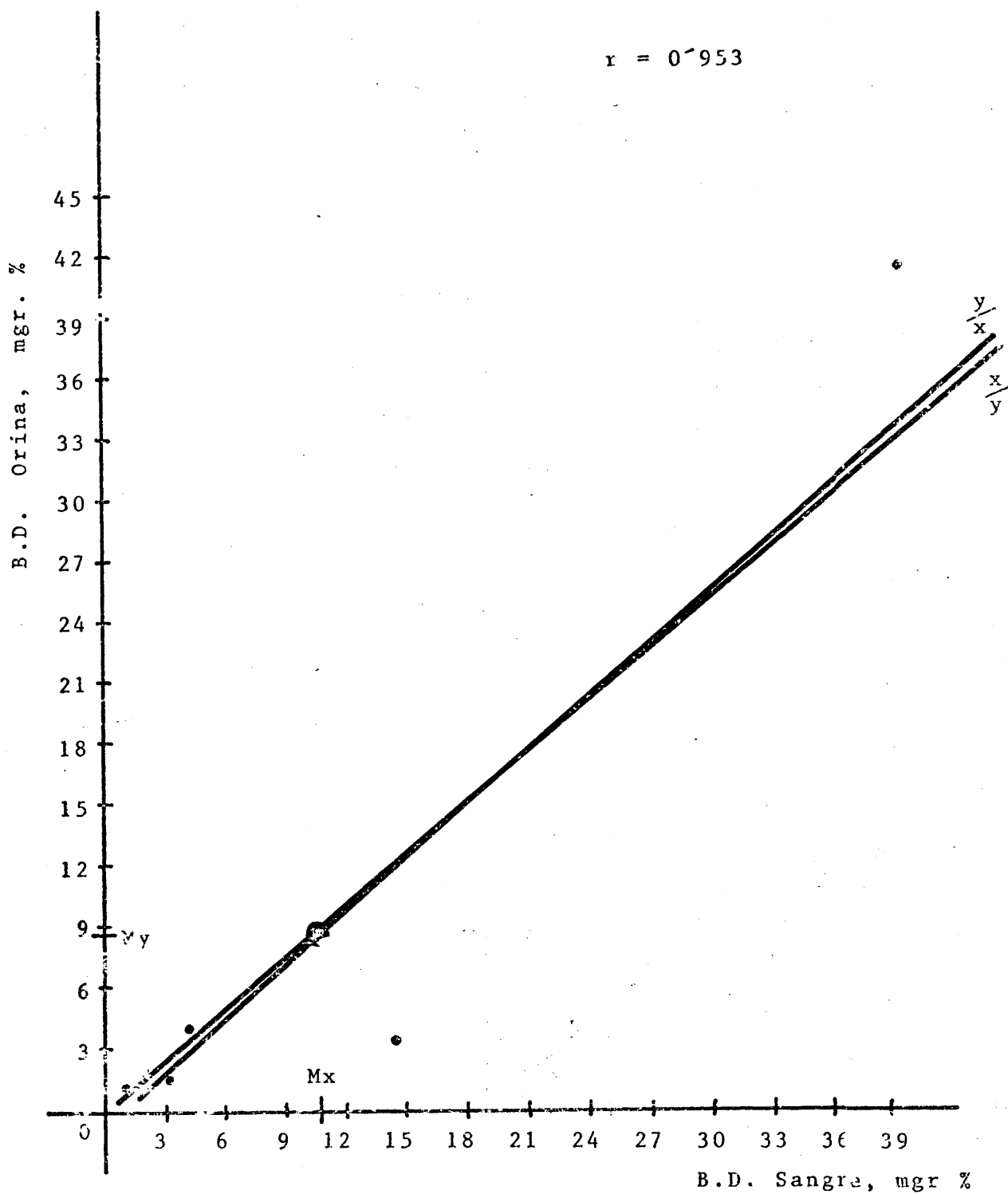


D e t e r m i n a c i o n e s   e n   S a n g r e

Caso	Alb.	G-glob.	Protr.	Bromo	Got	GPT	F.Alcal	L.A.P.
16	3,80	1,50	100	3	420	500	7,96	14,04
23	3,62	1,28	48	6	30	20	1,20	11,00
53	3,65	1,22	100		89	108		
59	3,60	1,30	100		820	560		
63	2,08	1,21	96		150	130	10,60	
64								
X	3,510	1,302	88,800	4,500	01,800	265,600	8,565	12,520
S.D	0,361	0,117	22,874	2,121	325,047	247,558	5,597	2,150
E.T.	0,161	0,052	10,229	1,500	145,723	110,731	2,790	1,520
C.V.	10,280	8,996	25,759	47,140	107,968	93,914	65,346	17,169

### COEFICIENTES DE CORRELACION

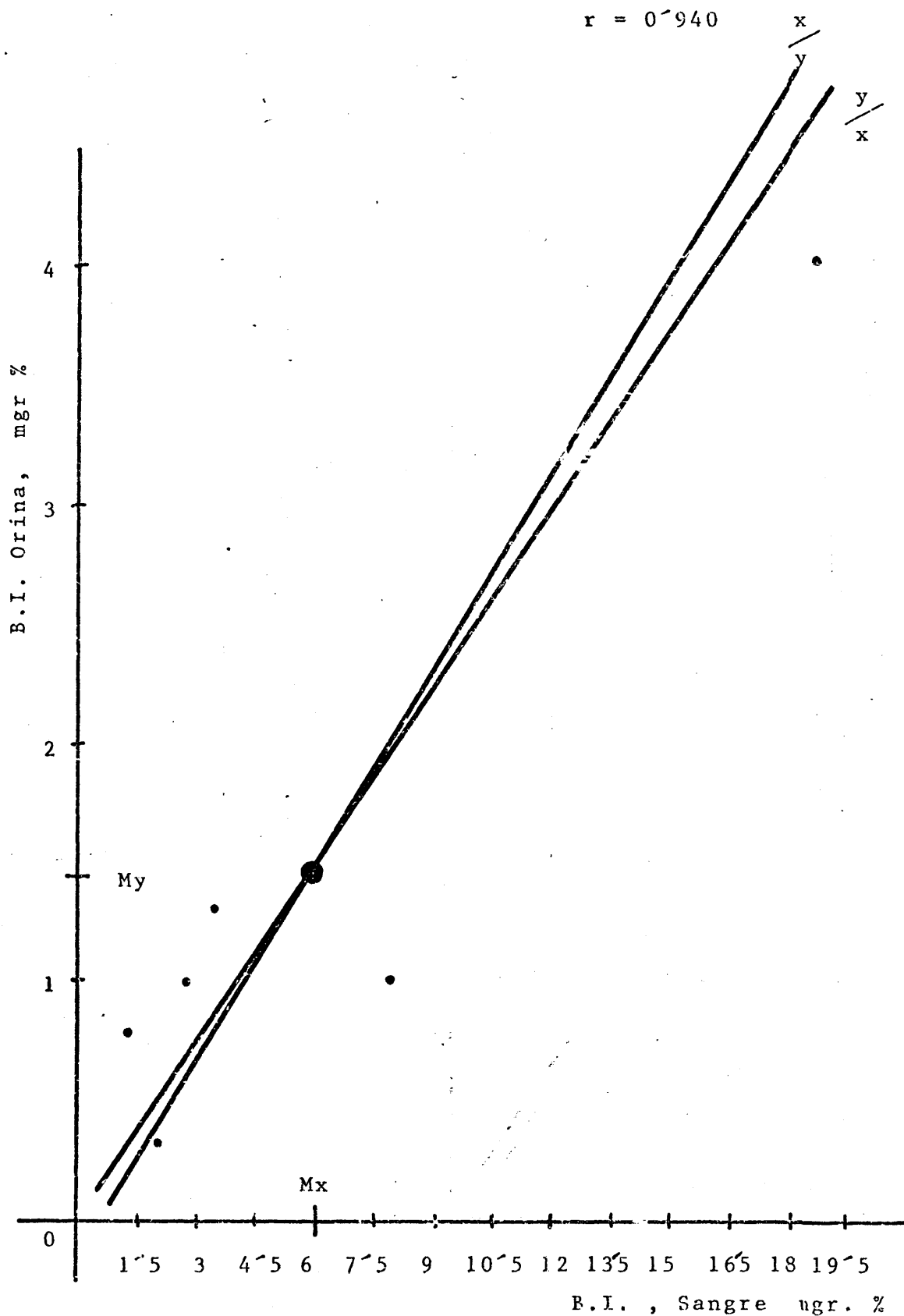
[illegible]



GRUPO A

FIG. 16

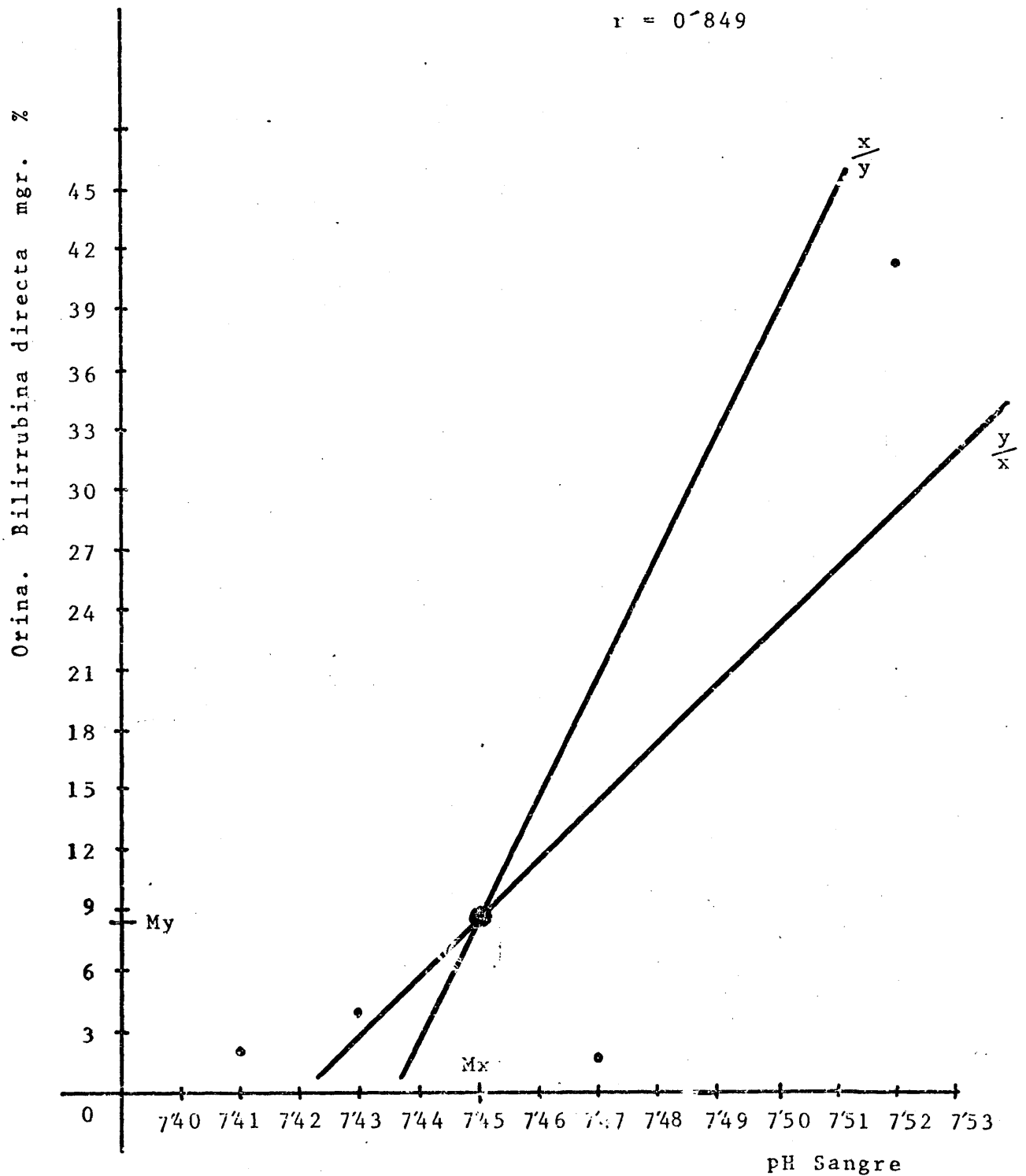
CORRELACION ENTRE TASAS DE BILIRRUBINA DIRECTA (B.D.)  
EN SANGRE • ORINA.



GRUPO A

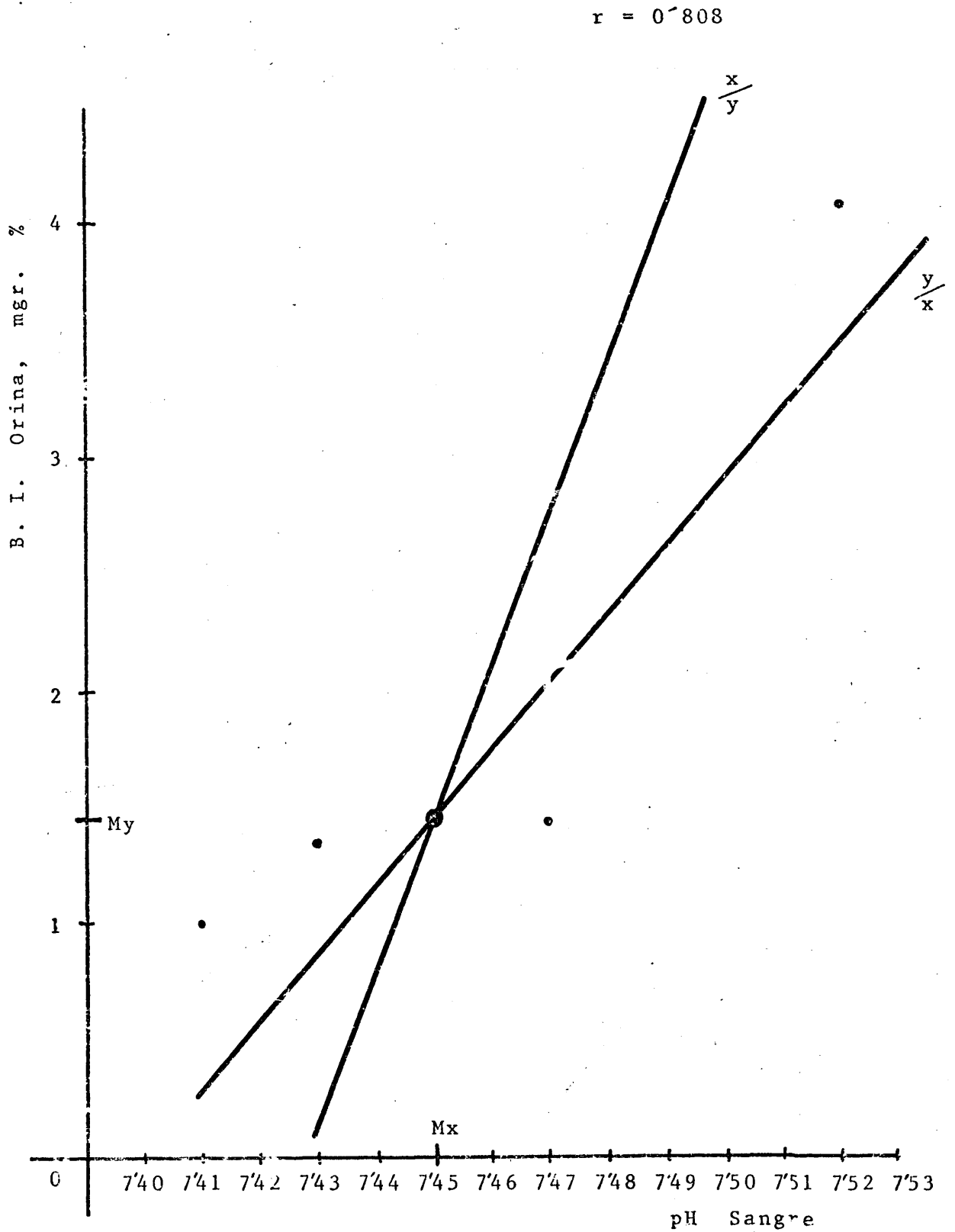
FIG. 17

CORRELACION ENTRE TASAS DE BILIRRUBINA INDIRECTA EN SANGRE Y ORINA.



GRUPO A  
FIG. 18

CORRELACION ENTRE pH DE LA SANGRE Y BILIRRUBINA DIRECTA  
(B.D.) EN ORINA.

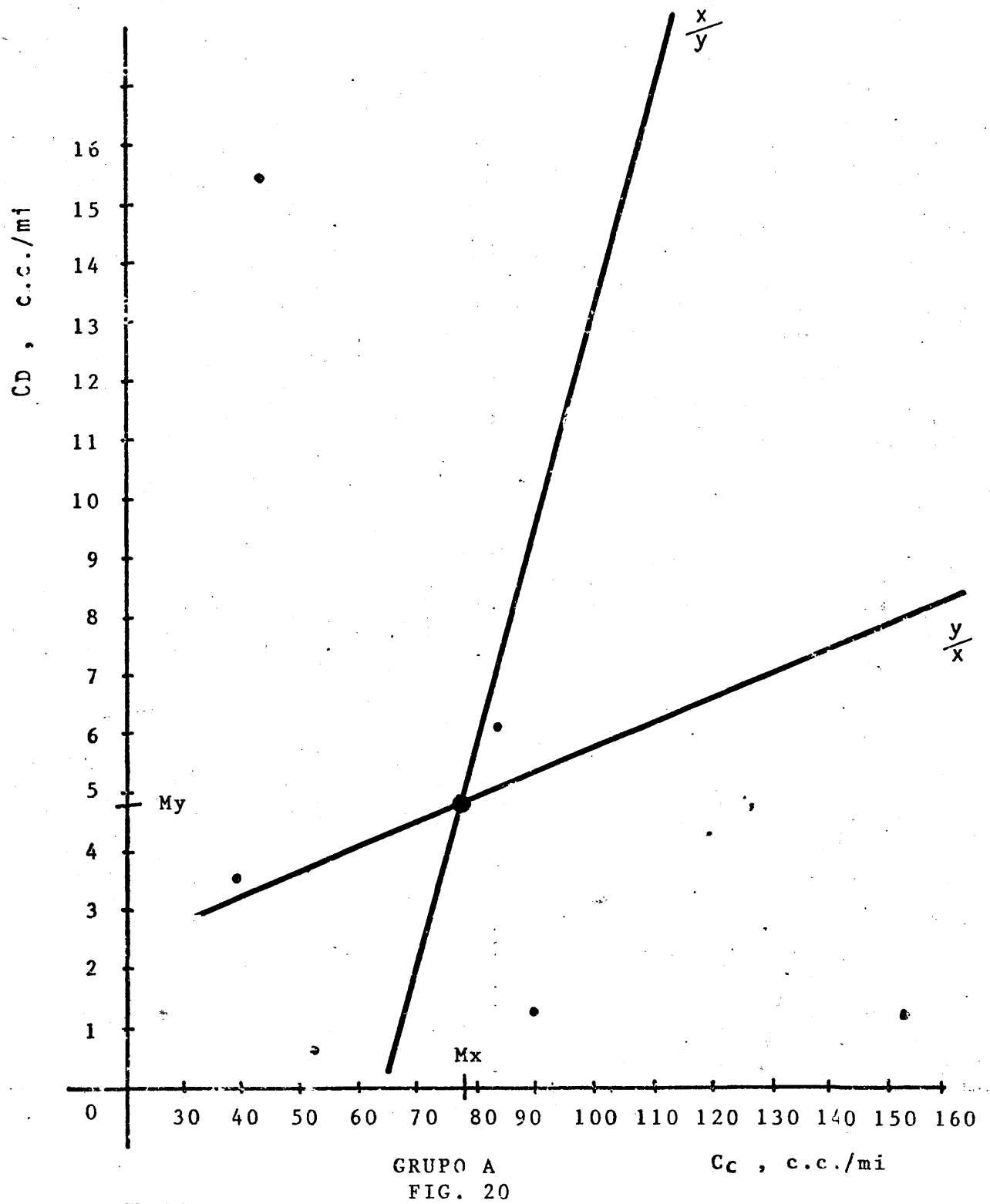


GRUPO A

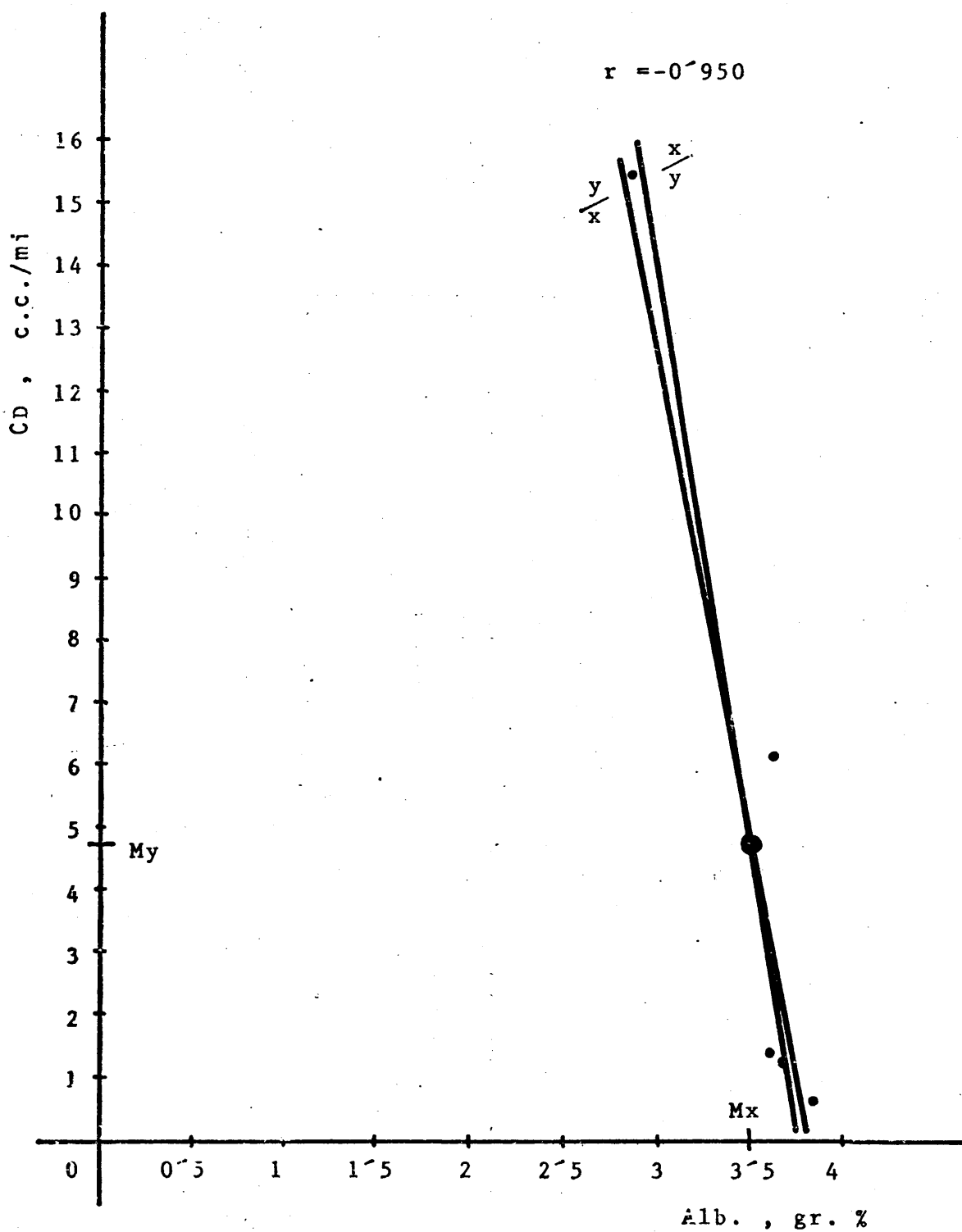
FIG. 19

CORRELACION ENTRE pH DE LA SANGRE Y BILIRRUBINA  
INDIRECTA (B.I.) EN ORINA.

$r = 0.429$



GRUPO A  
FIG. 20  
CORRELACION ENTRE ACLARAMIENTO CREATININA ( $C_c$ ) y  
ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA ( $C_d$ ).



GRUPO A

FIG. 21

CORRELACION ENTRE ALBUMINA PLASMATICA (Alb.) Y  
ACUMULAMIENTO DE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA (CD)



Grupo B. Subgrupo "a". Ictericias por hepatopatías difusas agudas.-

Este grupo está constituido por nueve determinaciones en nueve pacientes. Uno de ellos, hepatitis aguda postransfusional, portador de microesferocitosis. Los ocho restantes, hepatitis viral aguda. El sexto fue diagnosticado, también, de brucelosis, con clínica compatible con tal diagnóstico y aglutinaciones altamente positivas para el *Brucella melitensis*; no fue posible establecer una probable relación entre ambos procesos.

Los datos de dicho grupo están recogidos en la tabla III; y los resultados de las determinaciones, en las tablas XVI, XVII, XVIII y XIX.

Resultados.- Como podemos ver en dichas tablas, en este grupo hubo también un franco predominio de la bilirrubina monoglucuronizada en sangre, con un promedio de 86,44% y una derivación standard de  $\pm 12,94$ , menor que en el grupo de los normales, pero sin significación estadística ( $p > 0,1$ ). El promedio de bilirrubina diglucuronizada fue de 13,55%  $\pm 12,94$ .

También la bilirrubina directa en sangre (8,31 mgr%  $\pm 4,61$ ) predominó sobre la indirecta en el mismo medio (3,89  $\pm 2,25$ ). Así mismo ocurrió con la bilirrubina directa en orina (2,41 mgr%  $\pm 1,62$ ) respecto a la indirecta (0,52  $\pm 0,30$ ).

En relación a los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, predominó evidentemente el de la diconjugada (3,56 c.c./mi  $\pm 2,87$ ) sobre el de la monoconjugada (0,12  $\pm 0,20$ ). El aclaramiento de la bilirrubina monoglucuronizada, respecto a los normales, estuvo significativamente disminuido ( $p < 0,01$ ); el de la diglucuronizada, aunque también estuvo disminuido respecto a los normales, no hubo, sin embargo, significación estadística ( $p > 0,05$ ). En relación a los restantes grupos, las diferencias de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina tampoco fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,3$  para el grupo de ictericias hemolíticas;  $p > 0,4$  para el de hepatopatías difusas crónicas;  $p > 0,5$ , para el de hepatopatías tumorales; y  $p > 0,2$  para el grupo de ictericias obstructivas, respecto al aclaramiento de la monoconjugada. Y  $p > 0,6$ ,  $p > 0,8$ ,  $p > 0,05$  y  $p > 0,9$ , respectivamente, para el aclaramiento de la diconjugada).

Tampoco hubo diferencias estadísticas significativas en la relación de los aclaramientos (cociente  $D_i/Mono$ ) entre el grupo de las ictericias por hepatopatía difusa aguda y los restantes tipos de ictericias: A, "r", "c" y C ( $p > 0,9$ ,  $p > 0,1$

y  $p > 0,4$ , respectivamente). En cambio, dicho cociente ( $129,72 \pm 162,76$ ) en relación a los normales ( $22,47 \pm 15,21$ ), estuvo muy aumentado, estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

Correlaciones.- En la tabla XX hemos recogido algunos coeficientes de correlación entre las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina y sus aclaramientos, así como de la bilirrubina directa e indirecta, con otros parámetros determinados. Los comentaremos brevemente:

A diferencia del grupo de las ictericias por hemólisis, no hubo correlación entre las tasas de bilirrubina total, directa e indirecta en sangre repesto a las mismas tasas en orina ( $r=0,393$ ,  $0,423$  y  $0,176$ , respectivamente). En la figura 22 hemos representado gráficamente dicha correlación entre bilirrubina directa en sangre y en orina.

No se pudo comprobar existencia de correlación entre las tasas de bilirrubina directa e indirecta en orina con el pH de la sangre, ya que éste solo se determinó en dos pacientes, con lo que el coeficiente fué falsamente la unidad (por dos puntos solo pasa una línea recta).

Entre el pH de la orina y las tasas de bilirrubina total, directa e indirecta en orina, hubo, así mismo, mala correlación ( $r=0,056$ ,  $0,074$  y  $0,017$  respectivamente), igual que aconteció con el grupo de ictericias hemolíticas. Tampoco hubo buena correlación con el vol/mi de orina.

La tasas de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina en sangre se correlacionaron mal con las correspondientes tasas en orina ( $r=0,322$ ). Esta correlación se representa gráficamente en la figura 23 y es de tipo inverso. Podría interpretarse esta correlación inversa, admitiendo una elevada depuración renal de la bilirrubina diglucuronizada de la sangre, por lo que ésta estaría más lavada en orina que en aquél medio.

Igualmente mala fué la correlación de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina con el volumen minuto orina.

Respecto a los aclaramientos renales de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina con diversos parámetros las correlaciones fueron así todas ellas malas:

El aclaramiento de la monoonjugada se correlacionó mal con la tasa de mono glucuronizada en sangre ( $r=0,559$ ) y bien con dicha tasa en orina ( $r=0,805$ ).

El aclaramiento de la diconjugada no se correlacionó bien ni con su tasa en sangre ( $r=0,671$ ) ni con su tasa en orina ( $r=0,448$ ). La escasa correlación del aclaramiento de la diconjugada con su tasa en sangre está representada en la figura 24 ( $r=0,671$ ). Esta correlación también fué de tipo inverso.

Los aclaramientos de las fracciones también se correlacionaron mal con el pH de la orina ( $r=0,058$  y  $0,596$ , respectivamente), con el volumen minuto de orina ( $r=0,196$  y  $0,018$ ) y con la densidad de la orina ( $r=0,047$  y  $0,265$ ).

Tampoco existió correlación de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina con el aclaramiento de creatinina ( $r=0,513$  y  $0,360$ , respectivamente). Solo hubo moderada correlación de tipo inverso del aclaramiento de creatinina con la tasa de las fracciones glucuronizadas en orina ( $r=0,786$ ), lo que representamos en la figura 25.

Por último, los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina se correlacionaron también mal con la tasa de albúmina plasmática ( $r=0,450$  y  $0,141$ ), con la gamma-globulina ( $r=0,186$  y  $0,074$ ), con la tasa de protrombina ( $r=0,414$  y  $0,291$ ), con la GOT ( $r=0,603$  y  $0,152$ ), GPT ( $r=0,434$  y  $0,252$ ), fosfatasa alcalinas ( $r=0,056$  y  $0,055$ ) y la L.A.P. ( $r=0,420$  y  $0,635$ ).

Solo hubo buena correlación con la B.S.P. ( $r=0,866$  y  $0,911$ ). Quisimos ver si esta buena correlación de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas con la capacidad de conjugación hepática, medida por la B.S.P., tenía significación estadística, por cuanto el tamaño de la muestra (solo cuatro determinaciones de B.S.P.) nos parecía pequeño:

Aplicamos la fórmula tomada de Bancroft, pag. 187 (año 1969):

$$dt = \frac{1}{\sqrt{n-1}}$$

donde:

dt. desviación típica de  $\underline{r}$

$n = n^o$  de casos

$$d = \frac{1}{\sqrt{4-1}} = \frac{1}{\sqrt{3}} = \frac{1}{1,73} = 0,57$$

A partir de esa fórmula calculamos las desviaciones relativas de  $\underline{r}$ :

$$dr = \frac{r}{dt} = \frac{0,911}{0,57} = 1,59$$

Para esta desviación relativa, la tabla de áreas de la curva normal, pag. 76 de Bancroft (136) proporciona una probabilidad de:

$$0,0548 < P < 0,0668$$

Es decir, que la  $r$  era relativamente significativa, por lo que la correlación de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina con la B.S.P. es aceptablemente significativa, estadísticamente, en este grupo de hepatopatías agudas.

Dichas correlaciones las podemos apreciar en las figuras 26 y 27.

Conclusiones de los resultados en el grupo de las ictericias por hepatopatías difusas agudas.-

- 1) Predominio de la fracción monoglucuronizada en sangre y de la diglucuronizada en orina, sin significación estadística respecto al grupo de los normales.
- 2) Predominio del aclaramiento de la forma diconjugada respecto a la monoconjugada. Tampoco aquí encontramos diferencias estadísticas significativas con el grupo de los normales, ictericias hemolíticas, ictericias por hepatopatías difusas crónicas, hepatopatías tumorales e ictericias obstructivas.
- 3) Tanto la bilirrubina directa en sangre como en orina predominaron sobre la bilirrubina indirecta en los mismos medios.
- 4) Aumento estadísticamente significativo, respecto al grupo de los normales, pero no a los restantes grupos, del cociente del aclaramiento de la diconjugada por la monoconjugada.
- 5) No hubo buena correlación entre las tasas de bilirrubina total, directa e indirecta en sangre respecto a las correspondientes tasas en orina (a diferencia del grupo de ictericias por hemólisis) y respecto al pH de la orina y volumen minuto de orina.
- 6) No existió correlación entre las tasas de las fracciones glucuronizadas en sangre y las de la orina, así como las de ésta con el vol/mi de orina.
- 7) El aclaramiento de la monoconjugada se correlacionó con su tasa en orina, pero no con su tasa en sangre. El aclaramiento de la diconjugada no se correlacionó bien ni con su tasa en sangre ni con la de orina.
- 8) Los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina se correlacionaron mal con el pH de la orina, volumen minuto de orina, densidad de la orina y aclaramiento de creatinina. Solo hubo moderada correlación, de tipo

inverso, del aclaramiento de creatinina con la tasa en orina de las fracciones glucuronizadas.

9) Por último, los aclaramientos de las fracciones se correlacionaron mal con la tasa de albúmina plasmática, con la de gamma-globulina, con la protrombina, con la GOT, GPT, L.A.P. y fosfatasas alcalinas.

Solo hubo buena correlación de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina con la B.S.P. en este grupo de hepatopatías difusas agudas

Tabla XVI

G R U P O B.- SUBGRUPO "a".- <u>HEPATOPATIAS DIFUSAS AGUDAS</u>						
D e t e r m i n a c i o n e s e n S a n g r e						
Caso	Mono	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH
16	73	27	22,51	14,70	7,81	
20	96	4	9,57	6,41	3,16	
29	98	2	12,50	8,65	3,85	
38	89	11	7,15	4,85	2,30	
42	69	31	16,00	11,90	4,10	
44	93	7	2,20	1,60	0,60	
49	97	3	20,00	13,80	6,20	
57	67	33	14,75	9,53	5,22	7,47
58	96	4	5,20	3,40	1,80	7,48
X	86,444	13,556	12,209	8,316	3,893	7,475
S.D.	12,943	12,943	6,797	4,612	2,257	0,007
E.T.	4,314	4,314	2,266	1,537	0,752	0,005
C.V.	14,973	95,483	55,672	55,465	57,984	0,093

Tabla XVII

G R U P O B.- SUBGRUPO "a".- <u>HEPATOPATIAS DIFUSAS AGUDAS</u>									
D e t e r m i n a c i o n e s e n <u>O r i n a</u>									
Caso	Meno	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH	Dens.	Alb.	Vol./ml
16	12	88	4,10	3,10	1,00	6,0	1024		1,02
20	6	94	2,35	1,60	0,75	6,0	1025		0,51
29	47	53	0,94	0,62	0,32	7,0	1026		2,41
38	5	95	3,50	3,10	0,40	7,0	1015		0,62
42	59	41	6,20	6,00	0,20	6,0	1022		0,70
44	19	81	1,35	1,04	0,31	6,0	1011		0,90
49	8	92	1,98	1,66	0,32	5,6	1017	0,41	2,04
57	21	79	3,40	2,95	0,45	7,0	1009	(-)	1,38
58	15	85	2,65	1,65	1,00	5,5	1022	(-)	0,69
$\bar{X}$	21,333	78,667	2,941	2,413	0,523	6,233	1019	0,137	1,141
S.D.	19,007	19,007	1,596	1,621	0,308	0,604	6,245	0,237	0,672
E.T.	6,336	6,336	0,532	0,540	0,103	0,201	2,082	0,137	0,224
C.V.	89,093	24,161	54,269	67,149	58,360	9,692	0,613	73,205	58,916

Tabla XVIII

G R U P O B.- SUBGRUPO "a".- <u>HEPATOPATIAS DIFUSAS AGUDAS</u>				
Caso	Aclar. de Mono	Aclar. de Di	Cociente $\frac{Di}{Mono}$	Aclar. Creat.
16	0,030	0,660	22,00	52,50
20	0,007	12,990	427,00	67,30
29	0,080	1,380	17,25	214,00
38	0,030	3,430	114,00	143,84
42	0,670	1,040	1,55	187,00
44	0,120	6,830	56,92	86,00
49	0,020	7,590	379,00	89,00
57	0,130	1,000	7,69	138,00
58	0,050	7,150	143,00	115,00
$\bar{X}$	0,126	3,563	129,721	121,404
S.D.	0,208	2,877	162,767	54,400
E.T.	0,069	0,959	54,256	18,133
C.V.	165,023	80,747	125,475	44,809



Tabla XIX

G R U P O B.- SUBGRUPO "a".- <u>HEPATOPATIAS DIFUSAS AGUDAS</u>								
D e t e r m i n a c i o n e s    e n <u>S a n g r e</u>								
Caso	Alb.	G-glob.	Protr.	Bromo	GOT	GPT	F.Alcal	L.A.P.
16	3,80	1,50	100	3,00	420	500	7,96	14,04
20	4,05	0,92	100	2,50	195	286	7,30	19,00
29	3,13	1,48	100	5,00	189	207		
38	3,39	1,52	76		590	470	5,71	
42	3,11	1,88	76		2410	1850	7,52	42,00
44	3,09	1,01	86	21,00	139	168	6,37	55,00
49	3,57	1,80	76		1890	1690	11,51	
57	2,86	2,74	100		1220	1260	5,40	24,00
58	3,51	2,38	100		1660	1960	1,40	37,00
$\bar{X}$	3,390	1,692	90,444	7,875	968,111	932,333	6,647	31,040
S.D.	0,382	0,591	11,738	8,816	851,955	750,696	2,844	15,553
E.T.	0,127	0,197	3,913	4,408	283,985	250,232	1,006	6,349
C.V.	11,268	34,905	12,978	111,954	88,002	80,518	42,783	48,846

Tabla XX

G R U P O B.- SUBGRUPO "a".-HEPATOPATIAS DIFUSAS AGUDAS											
COEFICIENTES DE CORRELACION											
	MO-S	DI-S	BT-S	BD-S	BI-S	pH-S	pH-O	VOL/m	C <sub>m</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>C</sub>
MO-O	0,322							0,260	0,805		0,786
DI-O		0,322								0,448	0,786
BT-O			0,393				0,056	0,498			
BD-O				0,423		1?	0,074	0,420		0,493	
BI-O					0,176	1?	0,017	0,372			
DENS-O									0,047	0,265	
C <sub>m</sub>	0,559					1?	0,058	0,196			0,513
C <sub>D</sub>		0,671		0,446		1?	0,596	0,018			0,360
C <sub>C</sub>						1?	0,562	0,361			
ALBU.									0,450	0,141	0,669
G-GLO									0,186	0,074	
PROT.									0,414	0,291	
B.S.P.									0,866	0,911	
GOT									0,603	0,152	
GPT									0,434	0,252	
F.A.C.									0,056	0,055	
LAP									0,420	0,653	

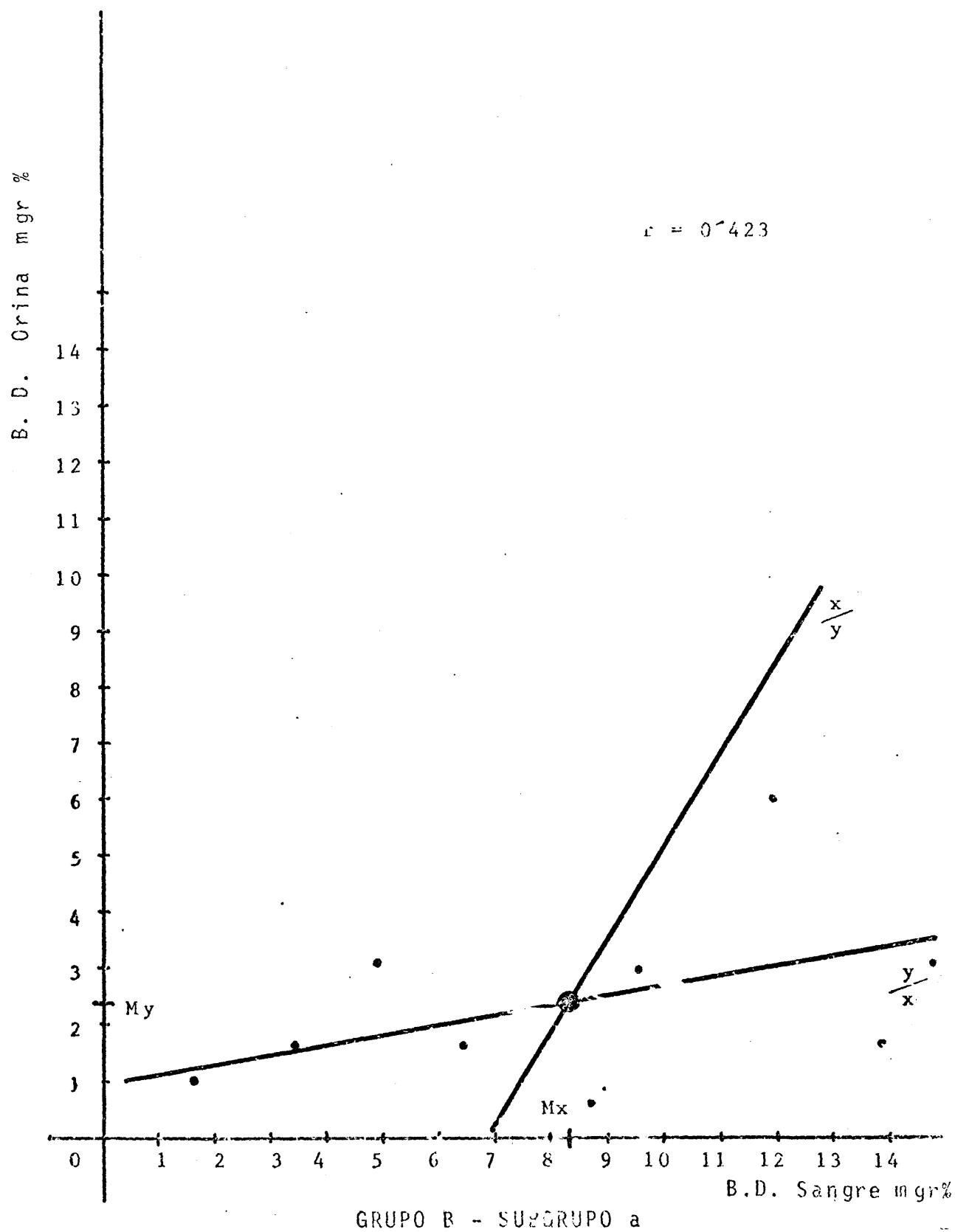
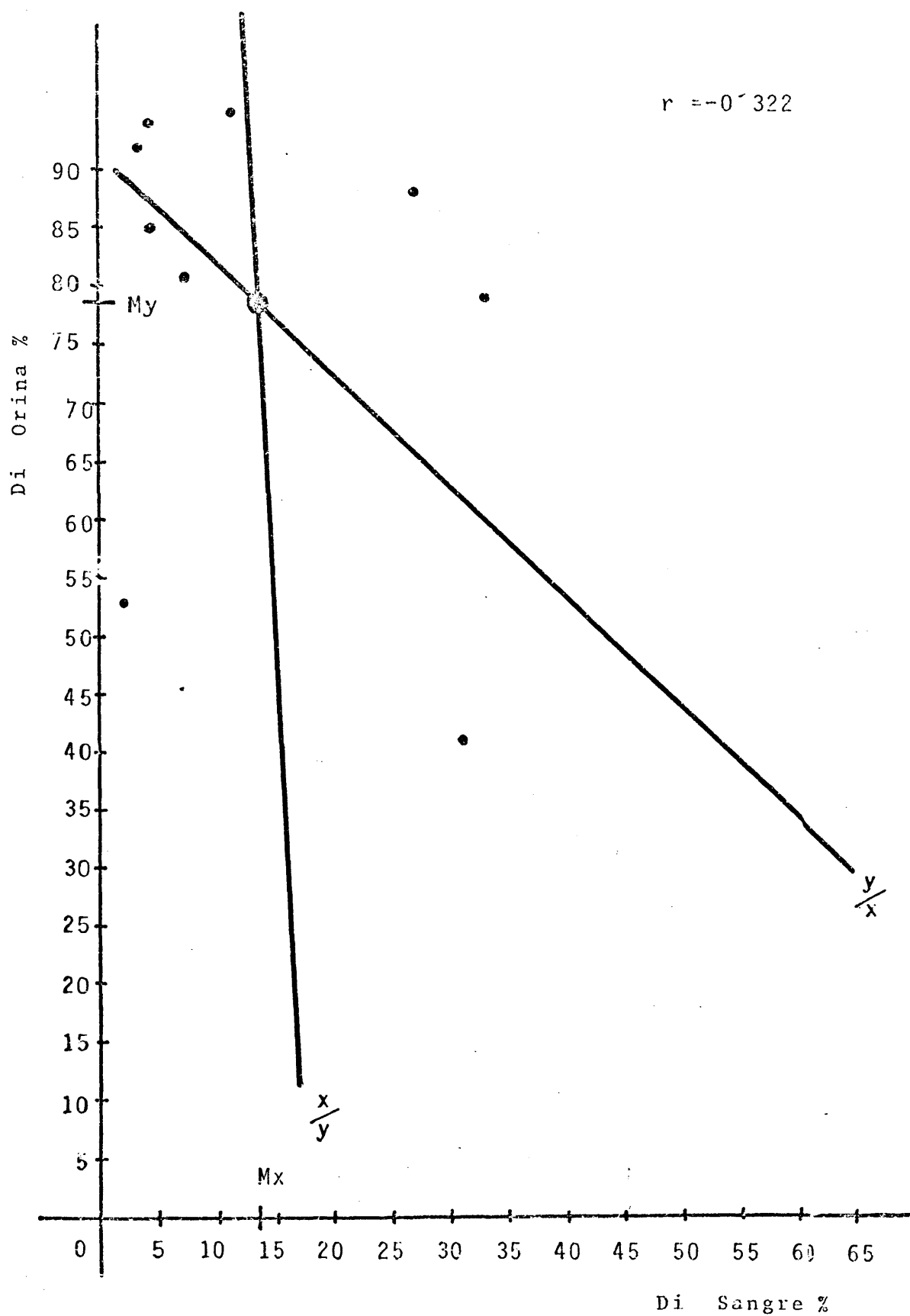


FIG. 22

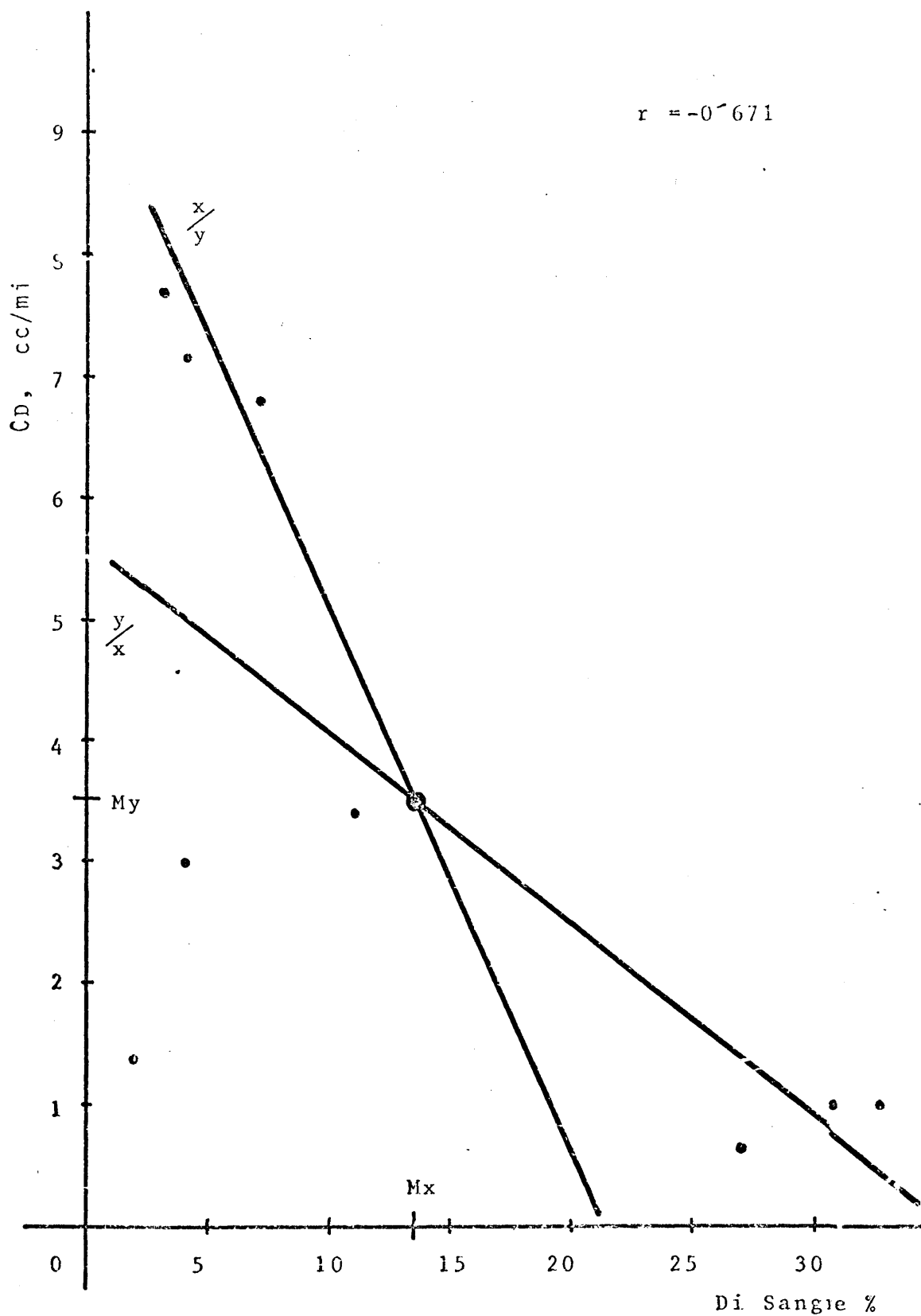
CORRELACION ENTRE BILIRRUBINA DIRECTA (B.D.) EN SANGRE Y EN ORINA.-



GRUPO B - SUBGRUPO a

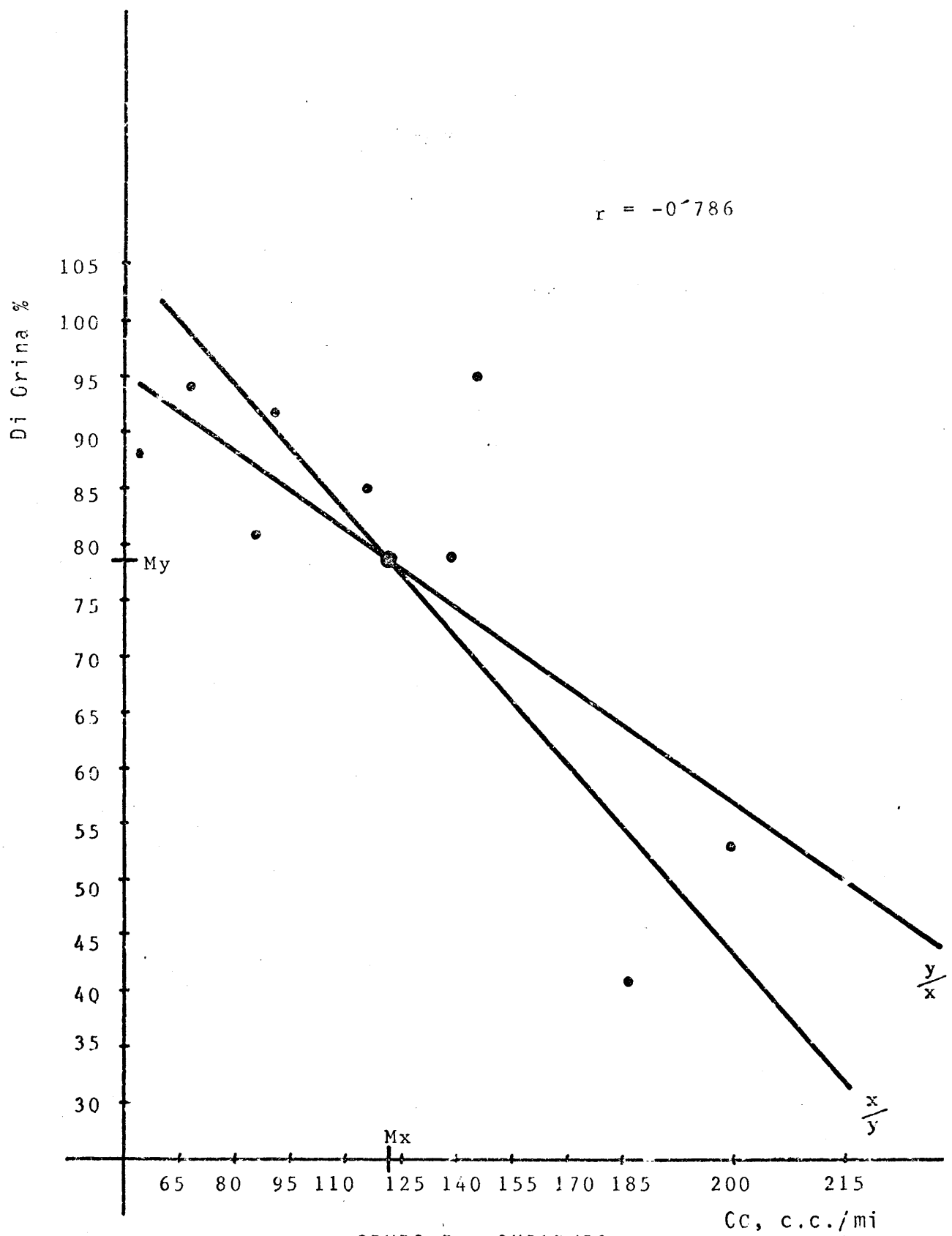
FIG. 23

CORRELACION ENTRE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA (Di)  
EN SANGRE Y EN ORINA.



GRUPO B - SUBGRUPO a  
FIG. 24

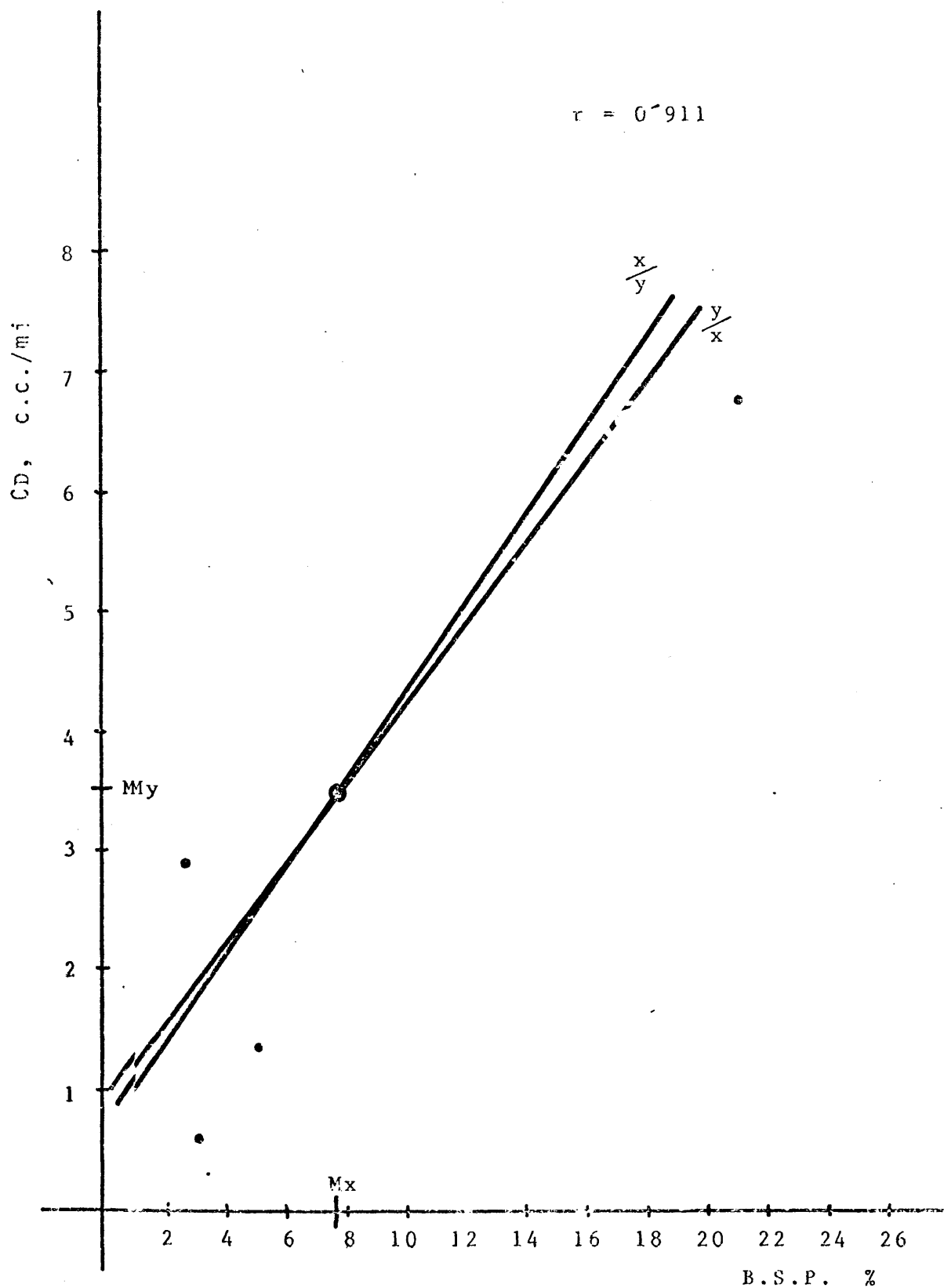
CORRELACION ENTRE TASA DE DICONJUGADA (Di) EN SANGRE  
Y SU ACLARAMIENTO (CD)



GRUPO B - SUBGRUPO a

FIG. 25

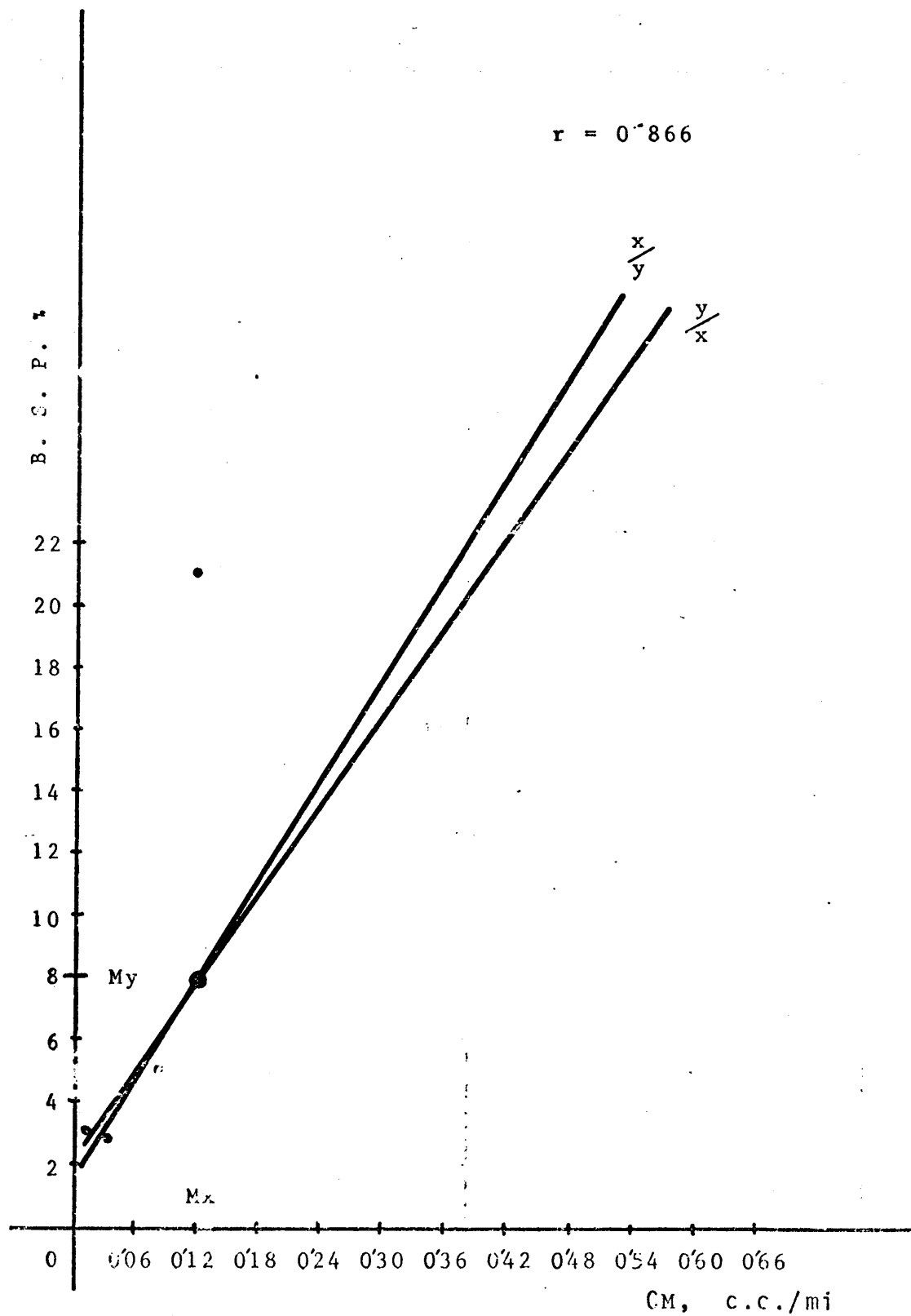
CORRELACION ENTRE EL ACLARAMIENTO DE CREATININA (Cc) Y LA  
TASA DE BILIRRUBINA DIGLUCOPONIZADA EN ORINA (Di)



GRUPO B - SUBGRUPO a

FIG. 26

CORRELACION DE LA B.S.P. CON EL AGUJAMIENTO DE BILIRRUBINIA DICONJUGADA (CD)



GRUPO B - SUBGRUPO a

FIG. 27

CORRELACION DE LA B.S.P. CON EL ACLARAMIENTO DE  
BILIRRUBINA MONOCONJUGADA (CM)



Grupo B. Subgrupo "b". Ictericias por hepatopatías difusas crónicas.-

Este grupo está constituido por dieciséis determinaciones en catorce enfermos. Tres fueron diagnosticados de hepatitis crónica agresiva, seis de cirrosis hepática postnecrónica, tres de cirrosis hepática septal, uno de síndrome de Gilbert y otro de síndrome de Rotor. Estos dos últimos fueron incluidos en este grupo por parecernos el más idóneo, ya que aunque el proceso no radicaba en una lesión orgánica objetivable, sino en un daño funcional, los datos clínicos, anlíticos, negatividad de los histológicos, etc. evidenciaban tales diagnósticos.

Los datos correspondientes a dicho grupo están recogidos en la tabla IV, y los resultados de las determinaciones, en las tablas XXI, XXII, XXIII y XXIV.

Resultados.- Como en los grupos anteriores la bilirrubina monoglucuronizada en sangre predominó sobre la diglucuronizada, con un promedio de la primera de 79,40 y una desviación standard de  $\pm 16,94$ . En orina predominó escasamente la diconjugada, con un promedio de 58,68%  $\pm 19,82$ . En relación a los normales, hubo una disminución de la monoconjugada en sangre estadísticamente significativa ( $p < 0,02$ ), y con más escasa significación estadística con el grupo de hepatopatías tumorales ( $p < 0,06$ ). Para los restantes grupos no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,6$ , para el grupo de ictericias hemolíticas;  $p > 0,2$  para el de hepatopatías agudas; y  $p > 0,6$ , para el grupo de ictericias obstructivas).

Tanto la bilirrubina directa en sangre como en orina predominaron sobre la indirecta en dichos medios.

El aclaramiento de la forma diglucuronizada (3,27 c.c./mi  $\pm 4,93$ ) predominó sobre la forma monoglucuronizada (0,17 c.c./mi  $\pm 0,10$ ). Respecto a los normales, ambos aclaramientos estuvieron significativamente disminuidos ( $p < 0,05$  para la diglucuronizada, y  $p < 0,001$  para la monoglucuronizada). En relación a los restantes grupos, no hubieron diferencias estadísticamente significativas:  $p > 0,4$  en relación a las ictericias hemolíticas;  $p > 0,4$ , hepatopatías difusas agudas;  $p > 0,6$ , hepatopatías tumorales; y  $p > 0,5$ , ictericias obstructivas, respecto al aclaramiento de la monoglucuronizada. Y  $p > 0,5$ ,  $p > 0,6$ ,  $p = 0,3$  y  $p > 0,9$ , respectivamente, para el aclaramiento de la diglucuronizada.

Correlaciones.- En la tabla XXV se ha reflejado algunos coeficientes de correlación de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina y sus aclaramientos, así como de la bilirrubina directa e indirecta, con diversos parámetros, que pasamos a comentar:

Como en el grupo de ictericias por hemolisis, y a diferencia del grupo de ictericias por hstopatias agudas, aquí también hubo buena correlación entre las tasas de bilirrubina total ( $r=0,881$ ) y la bilirrubina directa ( $r=0,874$ ) de la sangre con las correspondientes tasas en orina, lo que representamos en las figuras 28 y 29. La correlación de las tasas de bilirrubina indirecta en sangre con las de orina solo fué escasa ( $r=0,603$ ).

Respecto al pH de la sangre, solo existió discreta correlación con la tasa de bilirrubina directa en la orina ( $r=0,710$ ). Con el pH de la orina no encontramos ninguna correlación, ni para la bilirrubina total de orina ( $r=0,544$ ) ni para la directa ( $r=0,569$ ) ni para la indirecta ( $r=0,410$ ). Y lo mismo aconteció para el volumen minuto orina ( $r=0,031$ ,  $0,030$  y  $0,017$ , respectivamente).

En cuanto a las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, no hubo correlación de las tasas de las mismas en sangre con las de la orina ( $r=0,128$  y  $0,064$  respectivamente). Tampoco dichas tasas en orina se correlacionaron bien con el volumen minuto orina ( $r=0,462$ ).

Las correlaciones de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina con diversos parámetros, fueron casi todas ellas malas:

En primer lugar, el aclaramiento de la monoglucuronizada se correlacionó mal con su tasa en sangre ( $r=0,174$ ), pero se correlacionó bien con su tasa en orina ( $r=0,857$ ), lo que representamos en la gráfica de la figura 30. En cambio, el aclaramiento de la diconjugada se correlacionó escasamente con su tasa en sangre ( $r=0,069$ ), como vemos en la figura 31, y nada con su tasa en orina ( $r=0,461$ ).

Hubo mala correlación de los aclaramientos de las fracciones con el pH de la sangre ( $r=0,446$  y  $0,569$ , respectivamente), con el pH de la orina ( $r=0,039$  y  $0,211$ ), con el volumen minuto de orina ( $r=0,373$  y  $0,204$ ), con la densidad de orina ( $r=0,331$  y  $0,177$ ) y con el aclaramiento de creatinina ( $r=0,116$  y  $0,005$ ). Las correlaciones del aclaramiento de la diconjugada con el pH de la sangre y pH de la orina están representadas en las figuras 32 y 33, respectivamente.

Finalmente, la ausencia de correlación de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina con los restantes parámetros en sangre (albúmina plasmática, gamma-globulina, bromo etc.) se puede apreciar en la referida tabla XXV.

Conclusiones de los resultados en el grupo de las ictericias por hepatopatías difusas crónicas.-

1) Predominio evidente de fracción monoglucuronizada en sangre y escasamente de la fracción diconjugada en orina, con una disminución de la primera estadísticamente significativa respecto a los normales, pero no en relación con los restantes grupos.

2) Predominio del aclaramiento de la diglucuronizada respecto al de la monoglucuronizada. Dichos aclaramientos, respecto a los de los normales, estuvieron significativamente disminuidos; no hubo diferencias estadísticamente significativas a los restantes grupos.

3) Predominio de la bilirrubina directa, tanto en sangre como en orina.

4) Existió buena correlación entre las tasas de bilirrubina total y directa en sangre respecto a dichas tasas en orina. La correlación fué escasa para el caso de la bilirrubina indirecta.

5) Excepto una escasa correlación de la bilirrubina directa de la orina con el pH de la sangre, no se observó buena correlación de la bilirrubina directa e indirecta de orina ni con el pH de la sangre ni con el pH de la orina.

6) No hubo buena correlación entre las tasas de las fracciones glucuronizadas en sangre a las mismas en orina. Tampoco se correlacionaron con el volumen minuto de orina.

7) En relación a los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, hubo mala correlación con casi todos los parámetros comparados (pH de la sangre y de la orina, volumen minuto de orina, aclaramiento de creatinina, etc.) Solo el aclaramiento de la fracción monoconjugada se correlacionó bien con su tasa en orina.

Tabla XXI

G R U P O B.- SUBGRUPO "b" .- <u>HEPATOPATIAS CRONICAS</u>						
D e t e r m i n a c i o n e s c n <u>S a n g r e</u>						
Caso	Mono	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH
21	59	41	26,72	23,30	3,42	7,47
40	54	46	12,50	7,73	4,77	
61	97	3	2,95	1,85	1,10	
24	96	4	6,75	5,20	1,55	
30	85	15	7,50	5,00	2,50	
41	96	4	6,75	3,63	3,12	7,44
48	54	6	7,96	4,20	3,76	
52	91	9	14,75	9,76	4,99	
60	95	5	5,80	3,70	2,10	7,44
62	97	3	2,08	1,75	0,33	7,40
25	58	42	21,80	17,30	4,50	11,50
26	59	41	31,00	19,50	11,50	
34	74	26	7,96	3,50	4,46	
43	69	31	9,05	6,20	2,85	1,79
27	90	1	3,35	1,56	1,79	
31	67	33	11,55	8,42	3,13	
$\bar{X}$	79,40	19,37	11,15	7,68	3,49	7,45
S.D.	16,94	17,08	8,48	6,64	2,53	0,04
E.T.	4,37	4,27	2,12	1,662	0,63	0,02
C.V.	21,34	88,19	76,09	86,53	72,45	0,64

Tabla XXII

G R U P O B... SUBGRUPO "b" .- <u>HEPATOPATIAS CRONICAS</u>									
D e t e r m i n a c i o n e s e n <u>U r i n a</u>									
Caso	Mon	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH	Dens.	Alb.	Vol./ml
21	72	28	7,31	5,38	1,93	6,5	1008		1,41
40	13	87	1,25	1,14	0,11	6,5	1018		0,81
61	32	68	2,15	1,65	0,50	6,0	1024	(-)	0,52
24	55	45	2,50	2,29	0,21	7,0	1020		0,97
30	68	32	0,73	0,41	0,32	6,5	1031		5,00
41	61	39	0,62	0,50	0,12	5,8	1015		2,22
48	41	59	0,62	0,52	0,10	5,4	1010		1,87
52	35	65	2,50	2,25	0,25	7,0	1006	(-)	1,41
60	8	92	1,35	1,00	0,35	7,0	1010	(-)	1,00
62	10	90	1,55	1,35	0,20	5,8	1020	(-)	0,76
25	48	52	6,95	6,00	0,95	8,7	1020		0,69
26	42	58	7,50	5,60	1,90	7,2	1020		1,22
34	48	52	3,50	2,98	0,52	5,6	1019		0,41
43	24	76	1,00	0,90	0,10	6,0	1014		0,86
27	56	44	0,73	0,62	0,11	6,0	1016		0,72
31	48	52	3,35	2,85	0,50	5,6	1022		1,11
X	41,31	58,68	2,72	2,21	0,51	6,36	1017	0,0	1,31
S.D.	19,82	19,82	2,42	1,89	0,59	0,72	6,45	0,0	1,09
E.T.	4,95	4,95	0,60	0,47	0,14	0,18	1,61	0,0	0,27
C.V.	47,99	33,78	89,03	85,83	116,03	11,30	0,63	777	82,70

Tabla XXIII

G R U P O .B.SUBGRUPO "b" .-- <u>HEPATOPATIAS CRONICAS</u>				
Caso	Aclar. de Mono	Aclar. de Di	Cociente $\frac{Di}{Mono}$	Aclar. Creat.
21	0,390	0,220	0,56	110,70
40	0,020	0,220	11,00	145,00
61	0,230	12,510	54,00	111,60
24	0,240	4,800	20,00	148,80
30	0,320	0,870	2,71	96,00
41	0,190	2,980	15,68	302,00
48	0,100	2,220	22,20	172,00
52	0,120	2,340	19,50	29,40
60	0,020	4,970	248,00	91,42
25	0,170	0,330	1,94	55,00
26	0,240	0,490	2,04	70,00
34	0,220	0,690	3,13	129,00
43	0,040	0,300	7,50	172,00
27	0,160	1,250	7,81	135,00
31	0,260	0,590	2,26	83,50
62	0,060	17,580	293,00	113,00
$\bar{X}$	0,17	3,27	44,45	122,77
S.D.	0,10	4,93	89,60	62,20
E.T.	0,02	1,23	22,40	15,55
C.V.	62,44	150,71	201,54	50,66

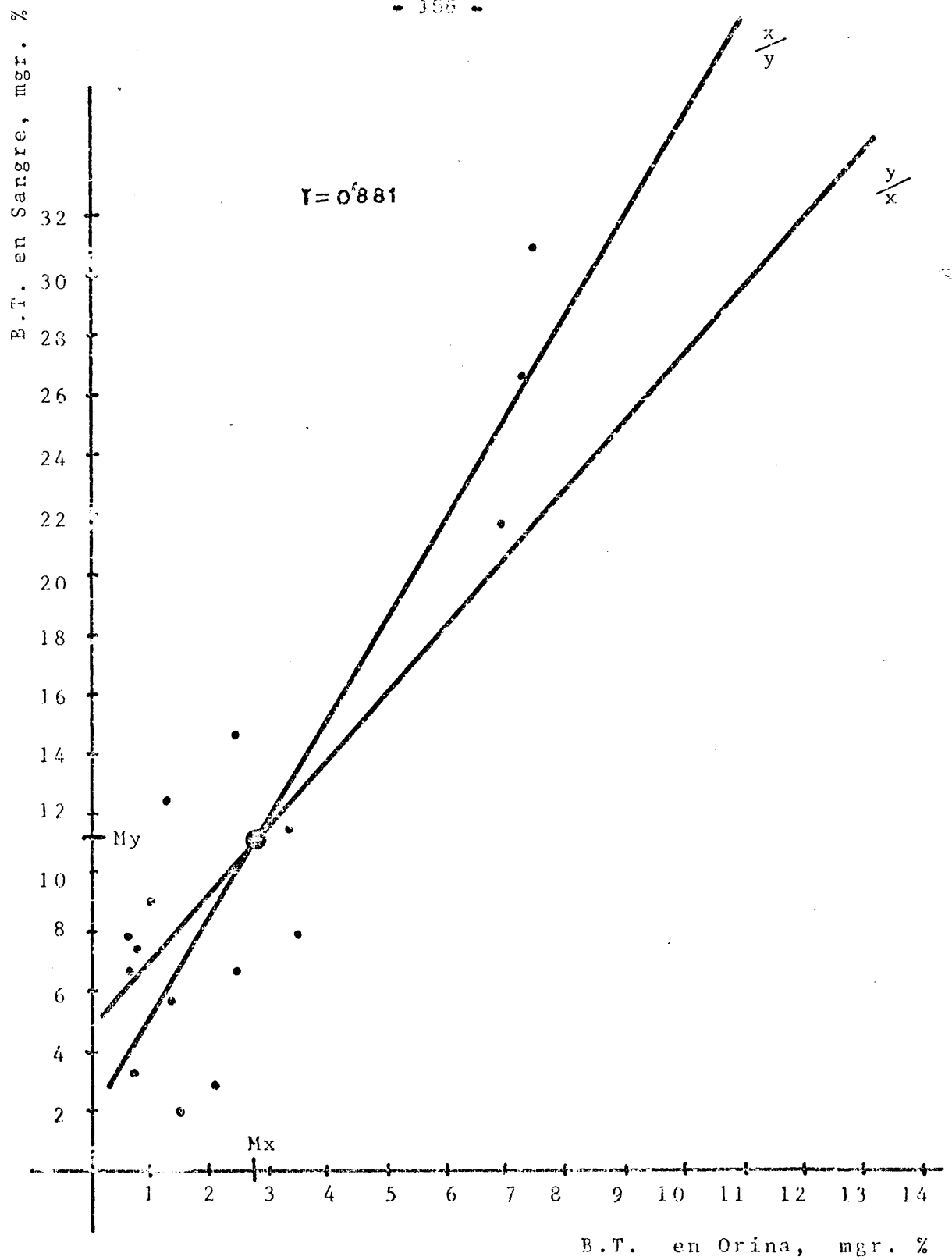
Tabla XXIV

GRUPO B.- SUBGRUPO "b" .- <u>HEPATOPATIAS CRONICAS</u>								
<u>Determinaciones en Sangre</u>								
Caso	Alb.	G-glob.	Protr.	Bromo	GOT	GPT	r.Alcal	L.A.P.
21	4,02	1,31	76		1500	1860	7,96	23,97
40	2,57	1,35	38		1080	420	10,11	55,00
61	3,25	1,73	66		40	20	5,60	21,00
24	3,21	1,50	58	13,90	44	36	2,15	34,60
30	3,20	2,86	48	25,30	108	68	15,01	41,00
41	2,44	2,65	32	38,90	67	27	6,37	15,20
48	3,11	2,18	55		215	135	11,97	24,00
52	2,58	3,12	58		2150	760		
60	2,28	3,55	38		62	37		15,10
62	2,39	2,64	58	26,60	215	144	15,00	29,00
25	2,85	2,18	100	36,00	1080	1260		30,04
26	2,85	2,18	100	36,00	1080	1260		30,04
34	2,17	2,69	48	39,50	108	40	5,71	34,40
43	3,72	1,90	55		1060	610	3,51	32,00
27	4,05	1,09	90	18,70	14	9	0,92	23,00
31	3,76	1,27	86	54,30	52	54	5,26	
$\bar{X}$	3,03	2,13	62,87	32,15	554,58	421,25	7,46	29,16
S.D.	0,61	0,73	21,66	12,29	568,48	575,82	4,67	10,47
C.V.	20,36	34,36	34,45	38,23	120,51	136,69	62,65	35,89
E.T.	0,15	0,18	5,41	4,09	157,12	143,95	1,35	2,79

Tabla XXV

G R U P O B.- SUBGRUPO "b" .-HEPATOPATIAS DIFUSAS CRONICAS											
COEFICIENTES DE CORRELACION											
	MO-S	DI-S	BD-S	BT-S	DI-S	pH-S	pH-O	VOL/m	C <sub>M</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>C</sub>
MO-O	0,128							0,462	0,857		0,152
DI-O		0,064								0,461	
BT-O				0,881			0,544	0,031			
BD-O			0,874			0,712	0,569	0,030		0,260	
BI-O					0,603		0,410	0,017			
DEN-O									0,331	0,177	
C <sub>M</sub>	0,174					0,446	0,039	0,373			0,116
C <sub>D</sub>		0,569	0,454			0,569	0,211	0,204			0,005
C <sub>C</sub>						0,688	0,530	0,102			
ALBU.									0,440	0,269	0,031
C-GLO									0,284	0,192	
PROT.									0,379	0,165	
B.S.P									0,163	0,298	
GOT									0,046	0,335	
GPT									0,301	0,350	
F-ALC									0,087	0,299	
LAP									0,073	0,266	





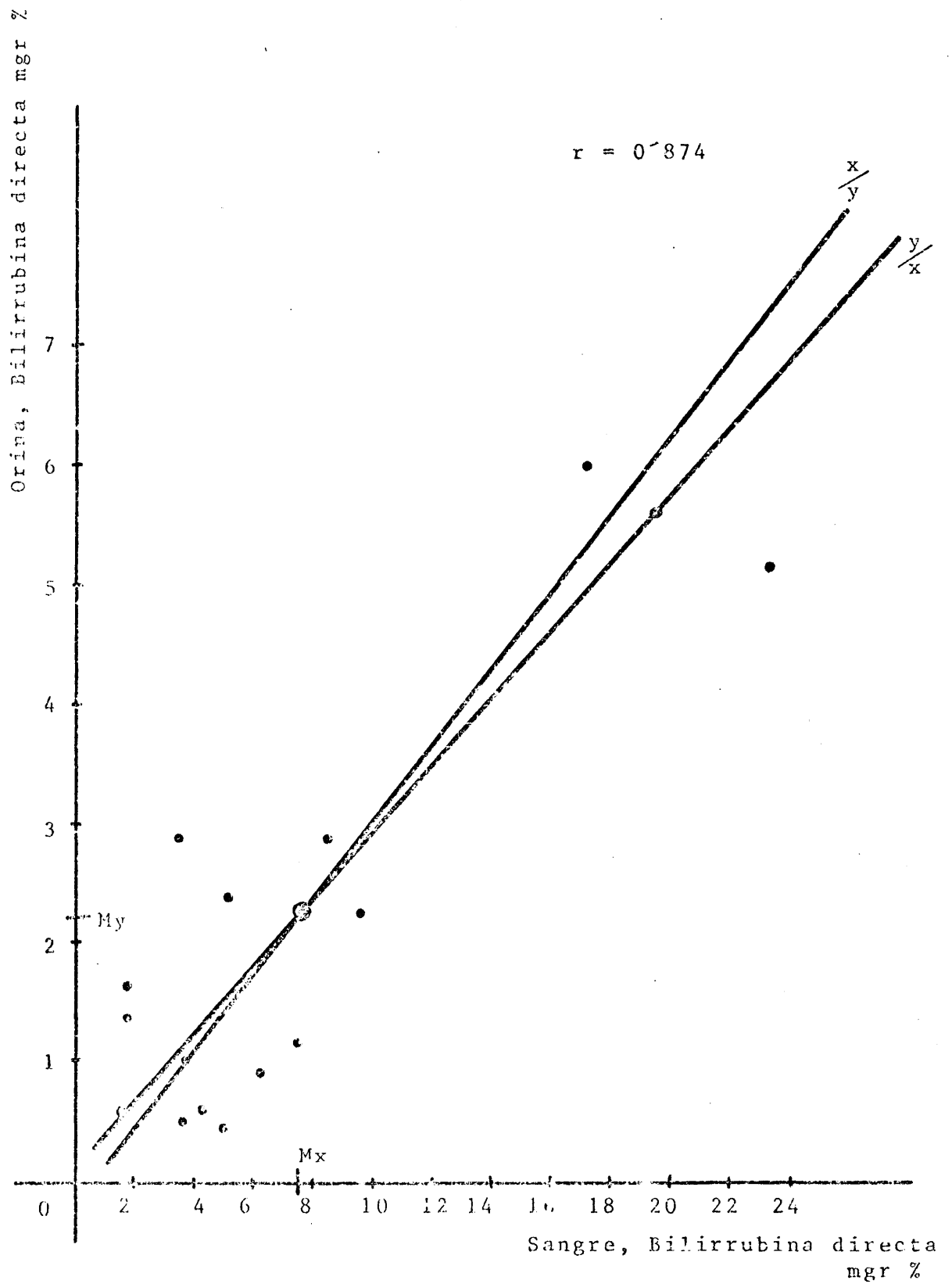
GRUPO B - SUBGRUPO b

FIG. 28

---

CORRELACION ENTRE BILIRRUBINA TOTAL (B.T.) EN SANGRE Y  
EN ORINA.

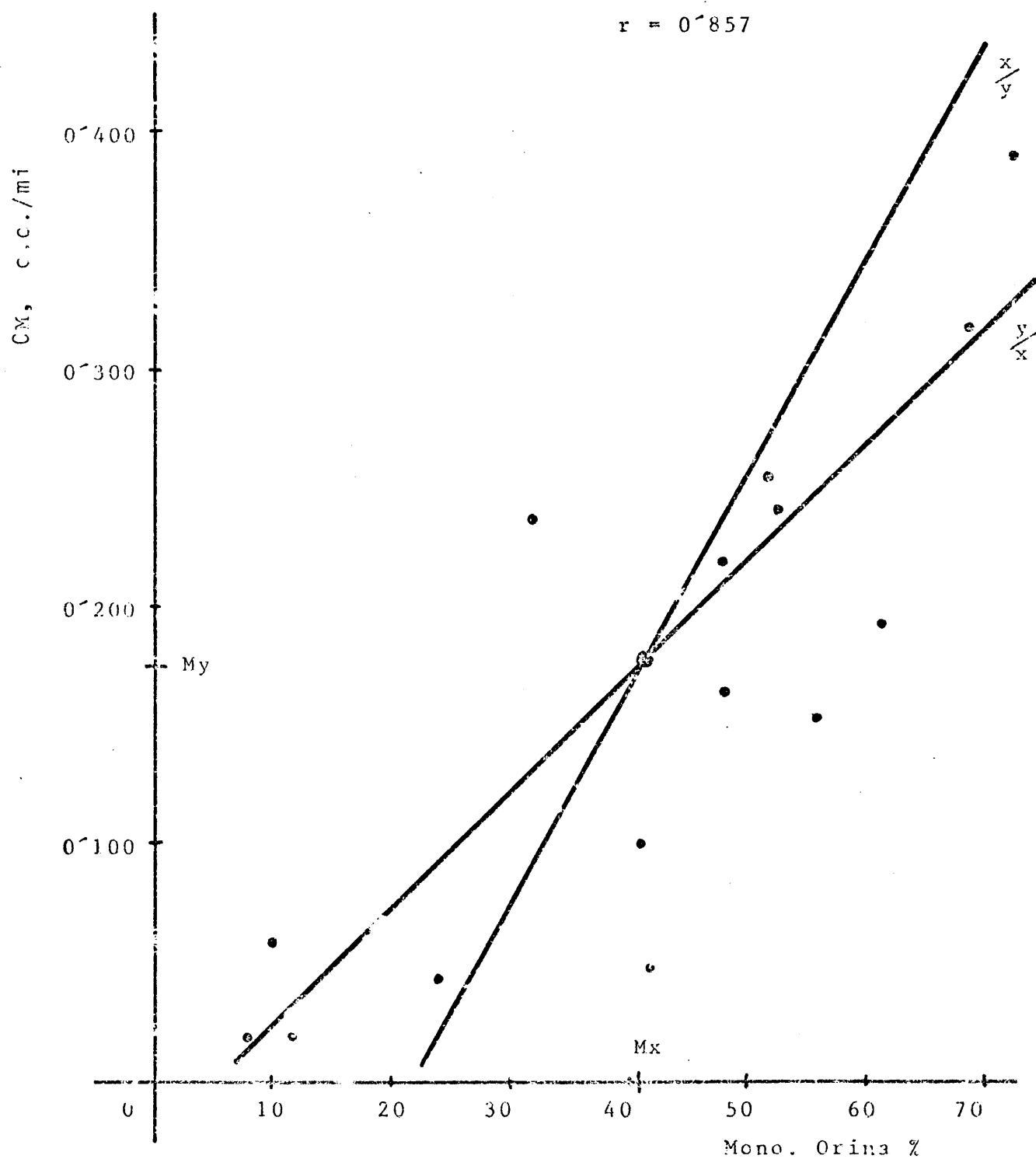
---



GRUPO B - SUBGRUPO b

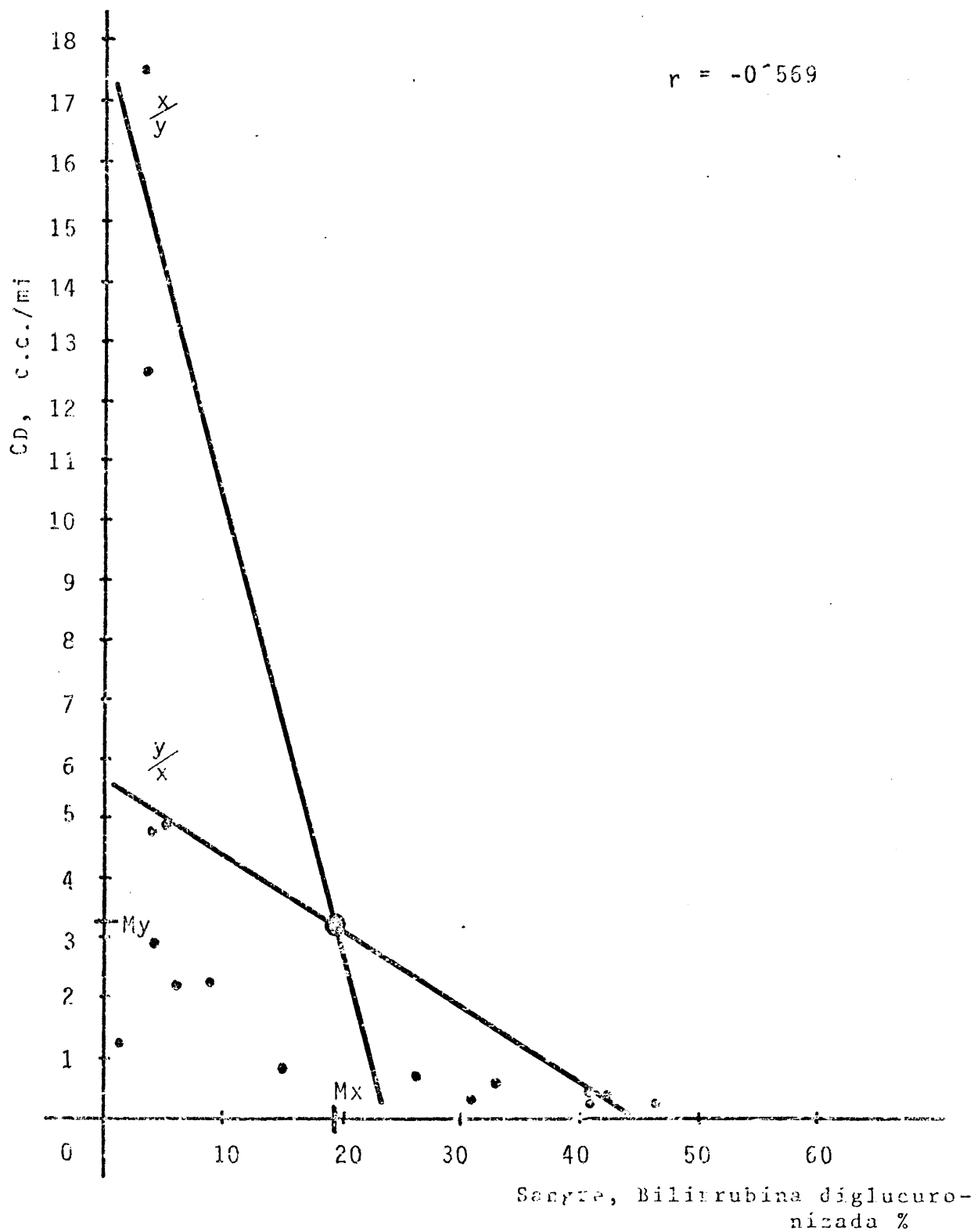
FIG. 29

CORRELACION ENTRE BILIRRUBINA DIRECTA EN SANGRE Y EN ORINA.



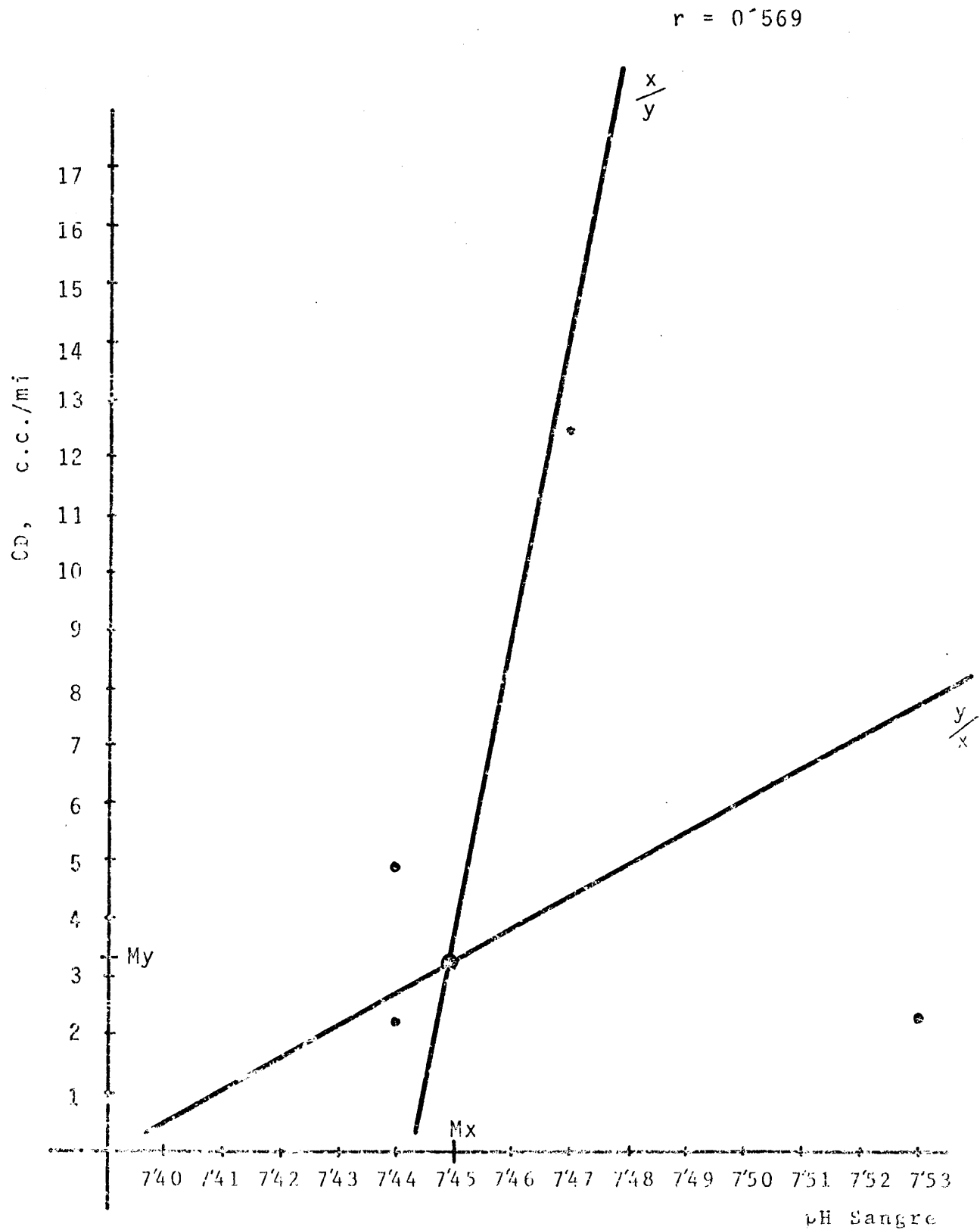
GRUPO B - SUBGRUPO b  
FIG. 30

CORRELACION ENTRE LA TASA DE BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA EN ORINA Y SU ACLARAMIENTO (CM)



GRUPO B - SUBGRUPO b  
FIG. 31

CORRELACION ENTRE LA TASA DE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA  
EN SANGRE Y SU ACLARAMIENTO (CD)

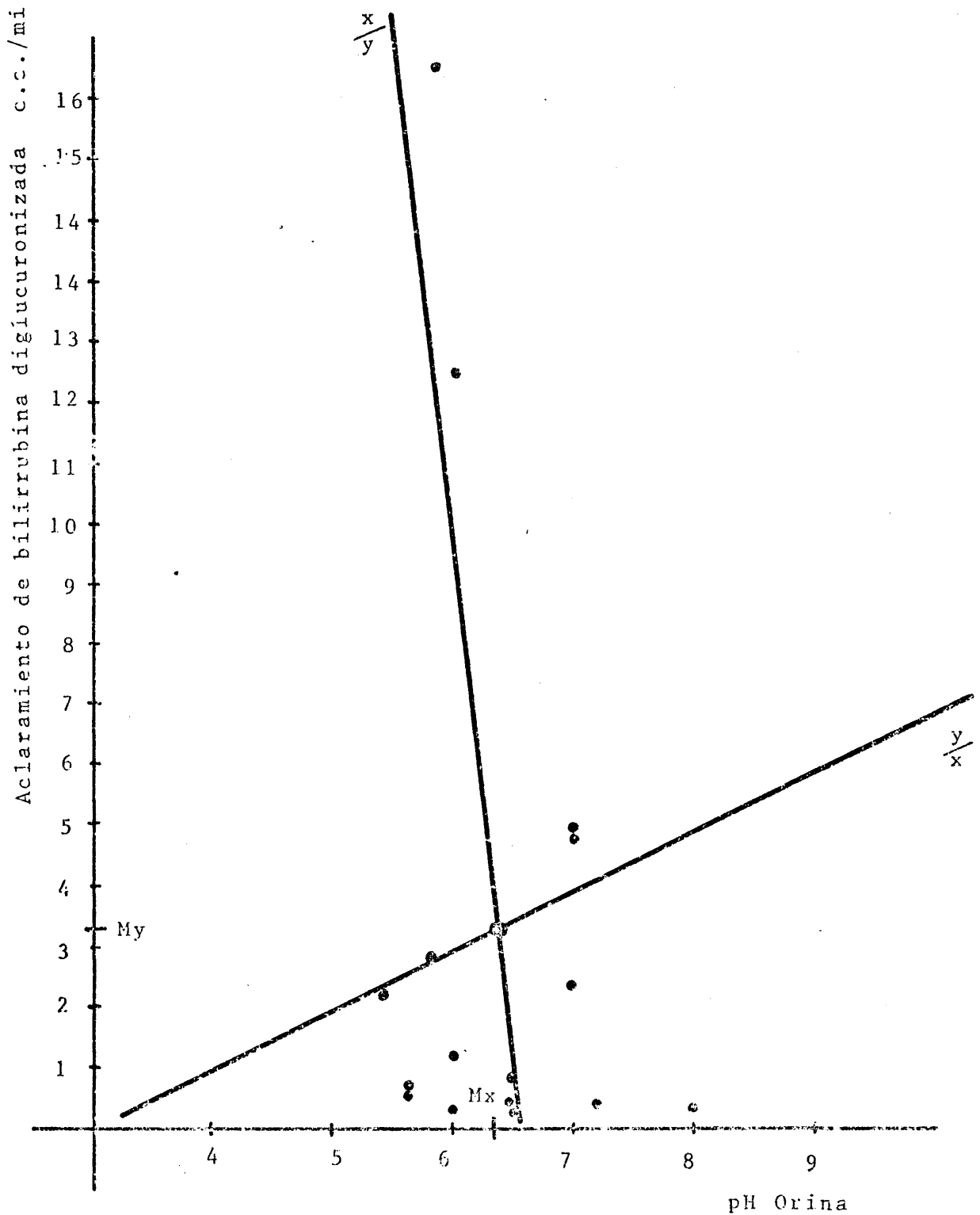


GRUPO B - SUBGRUPO b

FIG. 32

CORRELACION ENTRE EL pH DE LA SANGRE Y EL ACLARAMIENTO  
DE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA ( $C_b$ )

$$r = -0.211$$



GRUPO B - SUBGRUPO b

FIG. 33

CORRELACION ENTRE EL pH DE LA ORINA Y EL ACLARAMIENTO  
DE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA (Cd)

Grupo B. Subgrupo "c". Ictericias por hepatopatías tumorales.-

Este grupo consta de cuatro determinaciones en tres enfermos: uno con metástasis hepática por adenocarcinoma broncopulmonar. El segundo, se trataba de un niño de 7 años con carcinoma hepático primario, que falleció a los pocos días de su ingreso y cuya extirpe histopatológica no se pudo precisar, pero que por los rasgos clínicos, analíticos, estadísticos, etc. probablemente se trataba de angiosarcoma hepático. El tercero, hembra con cirrosis hepática postnecrótica en el seno de la cual tuvo origen el hepatoma.

En la tabla V se recogen los datos de los enfermos correspondientes a este grupo, y en las tablas XXVI, XXVII, XXVIII y XXIX, los resultados de las determinaciones realizadas.

Resultados.- También en este grupo, aunque en menor grado, predominó la bilirrubina monoglucuronizada en sangre sobre la diglucuronizada. La primera, con un promedio de 58,75%, con una desviación de  $\pm 19,95$ . A diferencia de todos los grupos anteriores, en orina también predominó la monoglucuronizada (51,25%  $\pm 19,24$ ) sobre la diglucuronizada (48,75%  $\pm 19,24$ ). Hubo un aumento de la monoglucuronizada en orina, respecto a las hepatopatías difusas agudas, estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ), pero sin diferencia significativa en relación a los restantes grupos ( $p > 0,05$  para los normales;  $p > 0,1$ , para las ictericias hemolíticas;  $p > 0,3$  para las hepatopatías difusas crónicas; y  $p > 0,6$  para las ictericias obstructivas).

Predominó la bilirrubina directa sobre la indirecta, tanto en sangre como en orina.

Así mismo, predominó el aclaramiento de la diconjugada (0,582 c.c./ml  $\pm 0,586$ ) sobre el de la monoconjugada (0,206 c.c./ml  $\pm 0,217$ ). Respecto al grupo de los normales, ambos aclaramientos estuvieron muy disminuidos, pero sin significación estadística ( $p > 0,05$  para ambos). Tampoco hubieron diferencias estadísticamente significativas para los restantes grupos ( $p > 0,9$ , para las hemolíticas;  $p > 0,5$ , para las hepatopatías difusas agudas;  $p > 0,6$ , para las hepatopatías difusas crónicas; y  $p > 0,6$ , para las ictericias obstructivas, respecto al aclaramiento de la monoconjugada. Y  $p > 0,1$ ,  $p > 0,05$ ,  $p = 0,3$  y  $p > 0,3$ , respectivamente, en relación al aclaramiento de la diconjugada).

Correlaciones.- En la tabla XXX se han recogido algunos coeficientes de correlación de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina y sus aclaramientos, así como de la bilirrubina directa e indirecta, con diversos parámetros, los cuales vamos a comentar seguidamente.

La tasa de bilirrubina directa en sangre se correlacionó escasa e inversamente con la correspondiente tasa en orina ( $r=0,726$ ), lo que representamos en la figura 34. La bilirrubina total e indirecta en los mismos medios se correlacionaron mal ( $r=0,477$  y  $0,105$ , respectivamente).

Hubo mala correlación de las tasas de bilirrubina total, directa e indirecta de orina con el pH de la orina ( $r=0,047$ ,  $0,0402$  y  $0,313$ , respectivamente). No se pudo comprobar la influencia, sobre dichos parámetros, del pH de la sangre, ya que no se determinó en ningún paciente de este grupo.

Tanto las tasas de mono como de la diconjugada en sangre, se correlacionaron excelentemente con las correspondientes tasas de orina ( $r=0,976$ , para ambas), lo que representamos en las figuras 35 y 36, respectivamente.

Las tasas de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina en orina se correlacionaron bien con el volumen minuto de orina ( $r=0,926$ ), fig. 37, pero no con el pH de la orina ( $r=0,279$ ).

Las correlaciones de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas fueron las siguientes:

Los aclaramientos se correlacionaron escasamente con sus correspondientes tasas en sangre:  $r=0,662$  para el aclaramiento de la monoconjugada, y  $r=0,609$  para el de la diconjugada.

En relación con el pH de la orina, hubo muy buena correlación para el aclaramiento de la monoconjugada ( $r=0,957$ ), figura 38, pero no para el de la diconjugada ( $r=0,264$ ).

Hubo mala correlación en ambos aclaramientos con el volumen minuto de orina ( $r=0,308$  y  $0,522$ , respectivamente); con el aclaramiento de creatinina ( $r=0,516$  y  $0,463$ ), figuras 39 y 40; con la tasa de albúmina plasmática ( $r=0,617$  y  $0,414$ ); y con la tasa de gamma-globulina ( $r=0,645$  y  $0,409$ ).

El aclaramiento de la mono-conjugada se correlacionó bien con la tasa de protrombina ( $r=0,966$ ), figura 41; con las tasas GOT ( $r=0,974$ ), figura 42; y con las de GPT ( $r=0,973$ ). Con la fosfatasa alcalina hubo escasa correlación



( $r=0,792$ ). En cambio, el aclaramiento de la diconjugada no se correlacionó bien con ninguno de aquéllos parámetros.

Ambos aclaramientos presentaron una "falsa ideal correlación" ( $r=1$ ) con la tasa de L.A.F., sin valor alguno, por cuanto dicho parámetro solo se determinó dos veces (por dos puntos pasa una línea recta.)

Conclusiones de los resultados en el grupo de ictericias por hepatopatías tumorales.

1) Escaso predominio de la bilirrubina diglucuronizada, tanto en sangre como en orina. El aumento de la monoglucuronizada en orina fué estadísticamente significativo en relación al grupo de hepatopatías difusas agudas, pero no en los restantes grupos.

2) Predominio del aclaramiento de la diconjugada sobre el de la monoconjugada. Aunque ambos aclaramientos estuvieron muy disminuidos respecto a los normales, esta diferencia no fué estadísticamente significativa. Tampoco lo fué para los restantes grupos.

3) Predominio de la bilirrubina directa sobre la indirecta, tanto en sangre como en orina.

4) La bilirrubina directa en sangre se correlacionó escasamente con la de la orina. La total y la indirecta se correlacionaron mal en ambos medios.

5) También se correlacionaron mal la bilirrubina total, directa e indirecta de la orina con el pH de la orina.

6) Tanto las tasas de la mono como de la diconjugada en sangre, se correlacionaron excelentemente con las correspondientes tasas en orina. Hubo también buena correlación de dichas tasas en orina con el volumen minuto de orina, pero no con el pH de la orina.

7) Los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina se comportaron así:

Se correlacionaron escasamente con las tasas de dichas fracciones en sangre.

El aclaramiento de la monoconjugada se correlacionó bien con el pH de la orina, con la tasa de protrombina y con la de GOT y GPT; hubo escasa correlación del mismo con la tasa de fosfatasa alcalina.

Ambos aclaramientos se correlacionaron mal con el volumen minuto de orina, con el aclaramiento de creatinina, con la tasa de albúmina plasmática y con la de gamma globulina.



Tabla XXVII

G R U P O B.- SUBGRUPO "c".- <u>HEPATOPATIAS TUMORALES</u>									
D e t e r m i n e c i o n e s e n <u>U r i n a</u>									
Caso	Mono	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH	Dens.	Alb.	Vol./ml
22	36	64	4,35	3,85	0,50	6,5	1002		1,63
35	36	64	1,56	1,25	0,31	5,5	1010		2,05
54	76	24	7,23	4,15	3,08	5,8	1013	(-)	0,56
56	57	43	7,00	4,30	2,70	5,6	1006	(-)	0,53
C.V.	37,54	39,47	52,62	42,42	87,71	7,70	0,47	0,00	61,35
X	51,25	49,75	5,03	3,30	1,64	5,05	1007	0,0	1,21
S.D.	19,24	19,24	2,66	1,43	1,45	0,45	4,78	0,0	0,74
E.T.	9,62	9,62	1,33	0,71	0,72	0,22	2,39	0,0	0,31

Tabla XXVIII

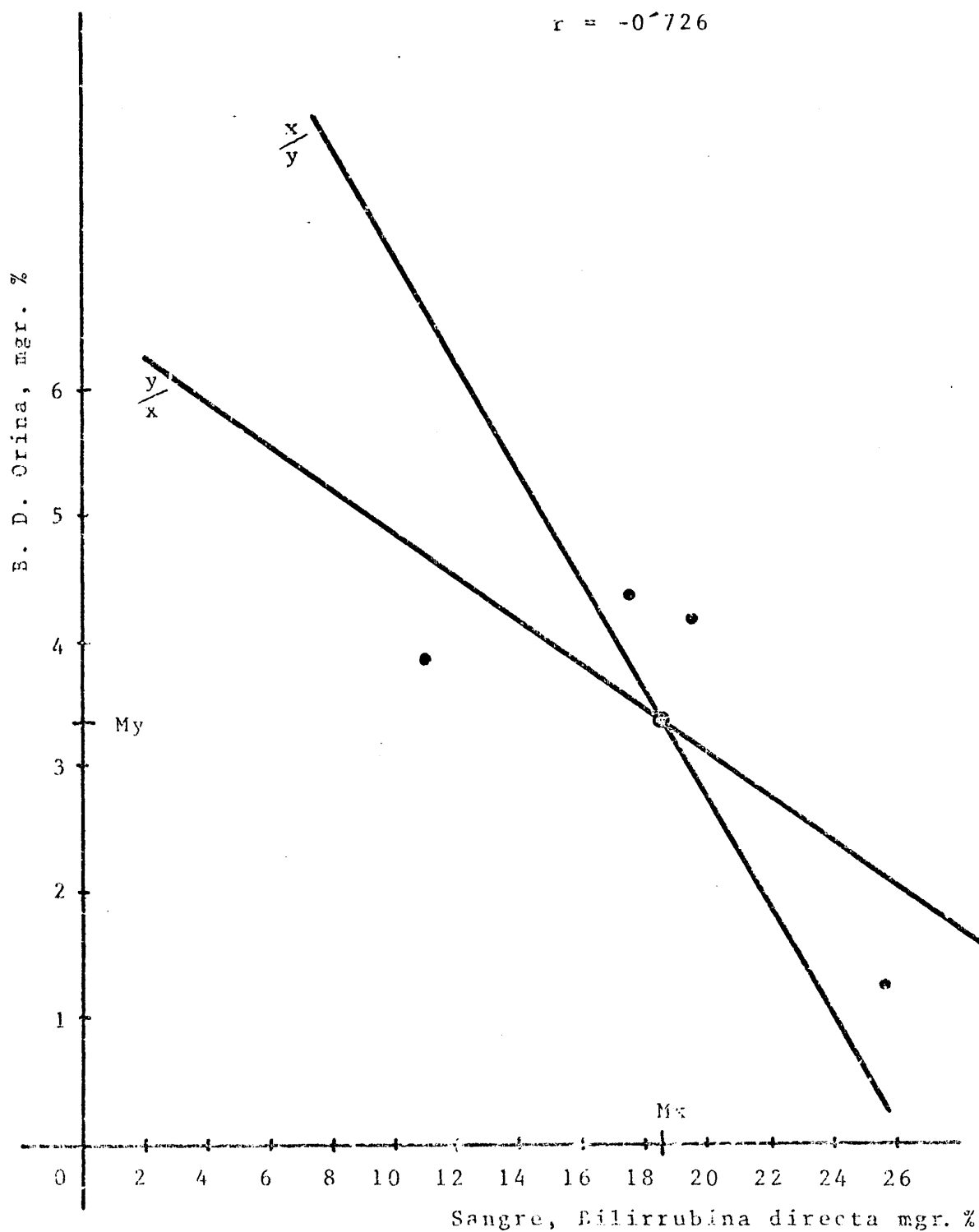
G R U P O B.- SUBGRUPO "c".- <u>HEPATOPATIAS TUMORALES</u>				
Caso	Aclar. de Mono	Aclar de Di	Cociente $\frac{Di}{Mono}$	Aclar. Creat.
22	0,530	0,580	1,09	60,40
35	0,076	0,120	1,57	60,29
54	0,090	1,410	15,66	11,85
56	0,130	0,220	1,69	12,24
X	0,20	0,53	5,00	36,19
S.D.	0,21	0,58	7,11	27,89
E.T.	0,10	0,29	3,55	13,94
C.V.	105,02	100,59	142,12	77,07

Tabla XXIX

G R U P O B.- SUBGRUPO "c".- <u>HEPATOPATIAS TUMORALES</u>								
D e t e r m i n a c i o n e s e n S a n g r e								
Caso	Alb.	G-glob.	Protr	Bromo	GOT	GPT	F.Alcal	L.A.P
22	3,24	1,06	100		95	115	28,00	
35	3,10	1,27	25		189	54	19,79	
54	2,39	2,07	42		182	40	8,80	24,60
56	2,59	2,07	52		198	52	9,20	26,00
X	2,73	1,61	54,75	777,00	166,00	67,75	16,40	25,30
S.D.	0,45	0,52	32,16	777,00	47,78	32,78	9,26	0,99
C.T.	0,22	0,26	16,00	777,00	23,89	16,93	4,63	0,70
C.V.	16,32	32,73	58,73	777,00	26,78	48,39	56,26	3,91

Tabla XXX

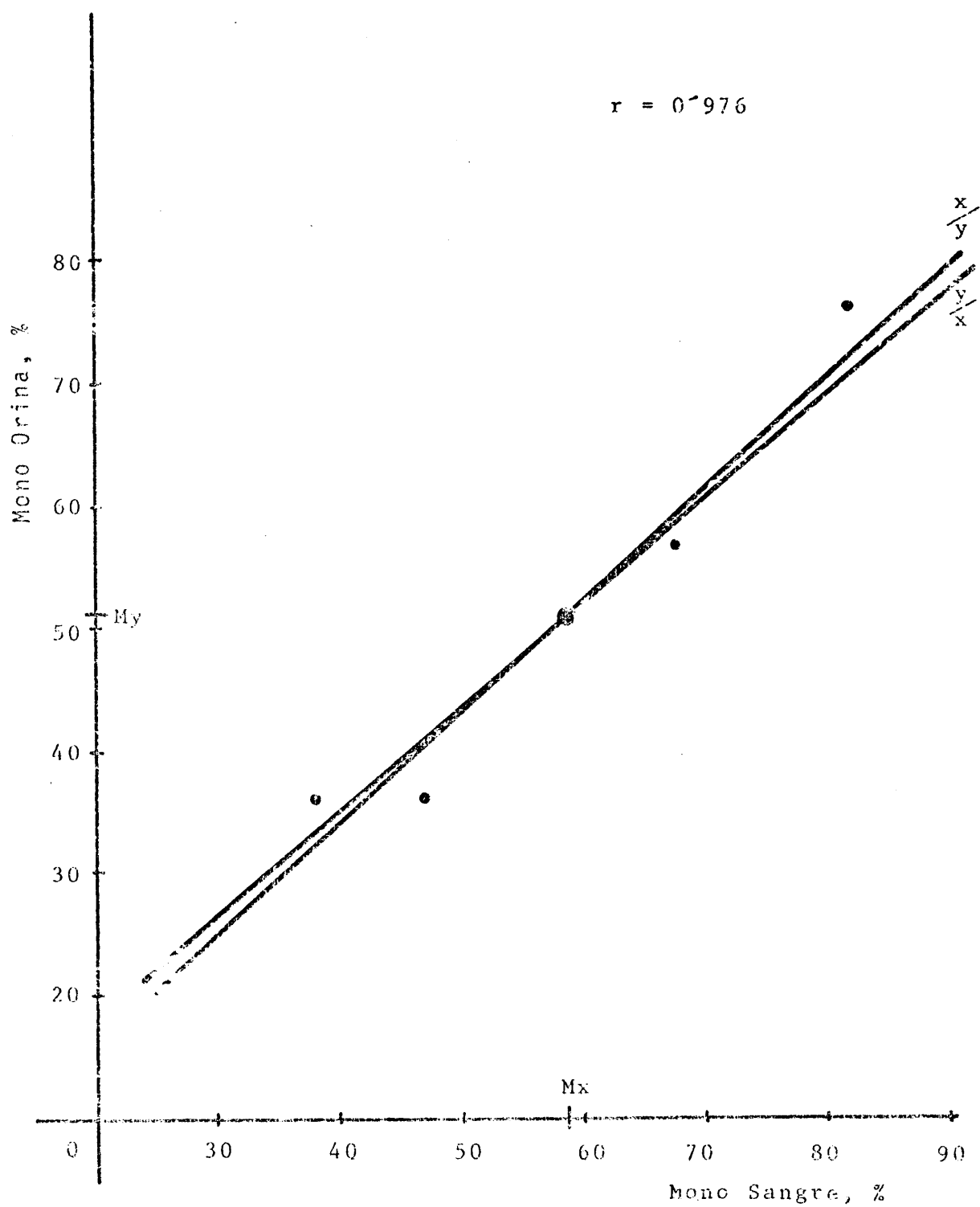
G R U P O B. - SUBGRUPO "c". - HEPATOPATIAS TUMORALES											
COEFICIENTES DE CORRELACION											
	MO-S	DI-S	BD-S	BT-S	BI-S	pH-B	pH-D	VOL/M	C <sub>M</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>C</sub>
MO-O	0,796							0,926	0,501		0,918
DI-O		0,976					0,279	0,926		0,754	
BD-O				0,477			0,047	0,976			0,802
BT-O			0,726				0,402	0,817		0,510	0,671
BI-O					0,105		0,313	0,964			0,993
DEN-O									0,845	0,470	
C <sub>M</sub>	0,662						0,957	0,308			0,516
C <sub>D</sub>		0,609	0,207				0,264	0,599			0,463
C <sub>C</sub>							0,304	0,963			
ALBU.									0,617	0,414	
G-GLO									0,645	0,400	
PROT.									0,966	0,072	
B.S.P											
GOT									0,974	0,105	
GPT									0,973	0,254	
F-ALC									0,792	0,324	
LAP									1	1	



GRUPO B - SUBGRUPO c

FIG. 34

CORRELACION ENTRE TASA DE BILIRUBINA DIRECTA  
EN SANGRE Y EN ORINA.

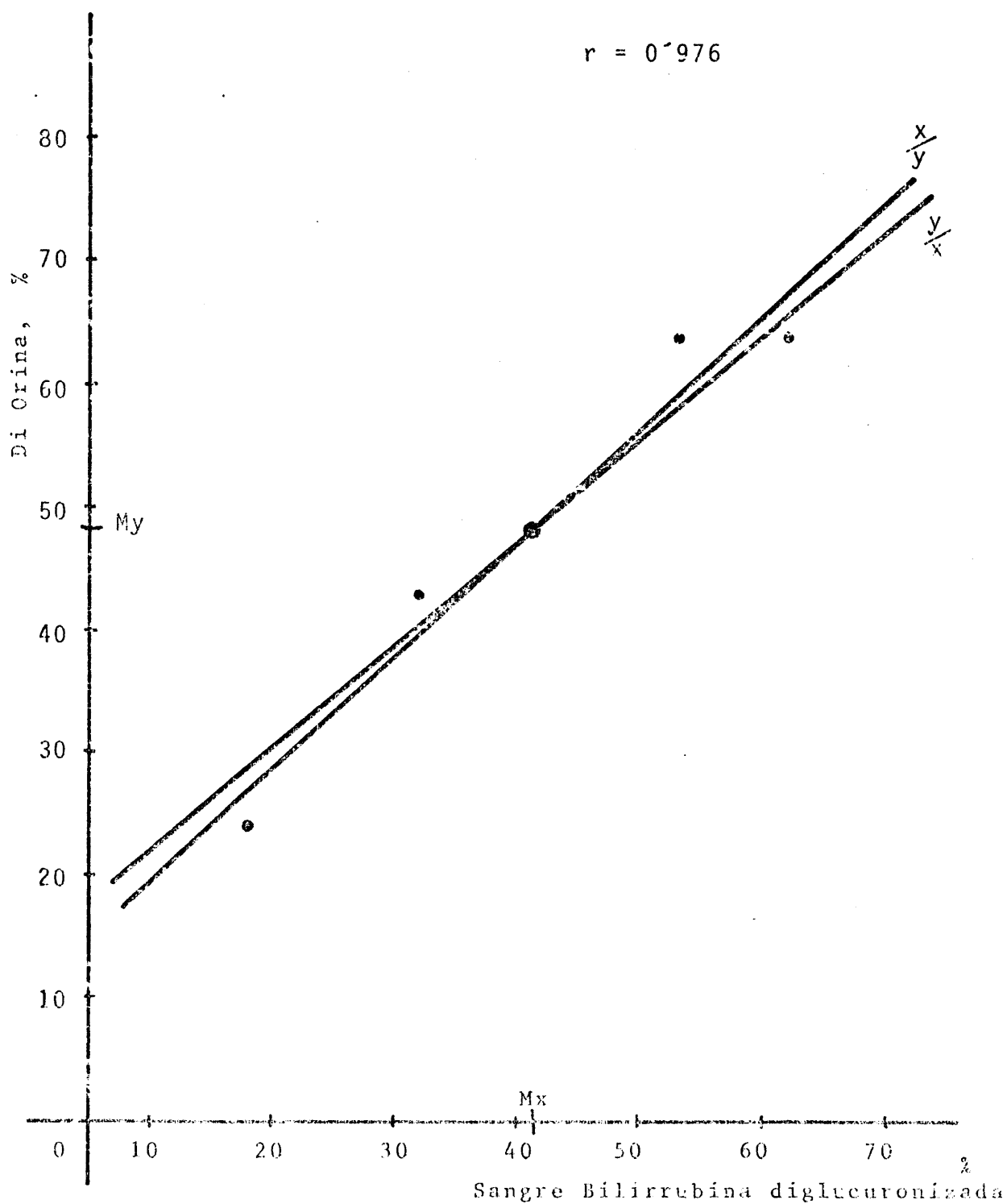


GRUPO B - SUBGRUPO c

FIG. 35

CORRELACION ENTRE LAS TASAS DE BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA EN SANGRE Y EN ORINA.

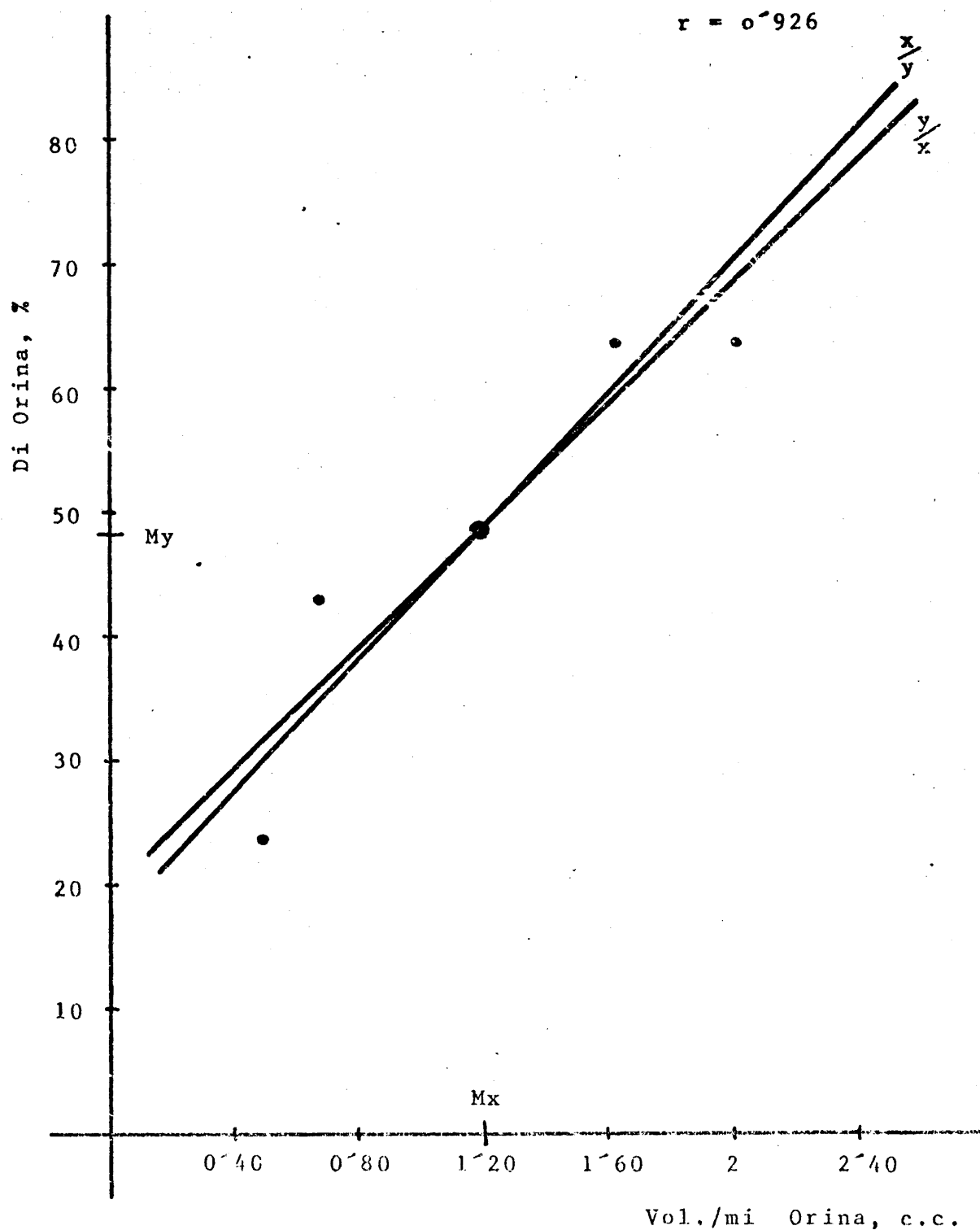




GRUPO B - SUBGRUPO c

FIG. 36

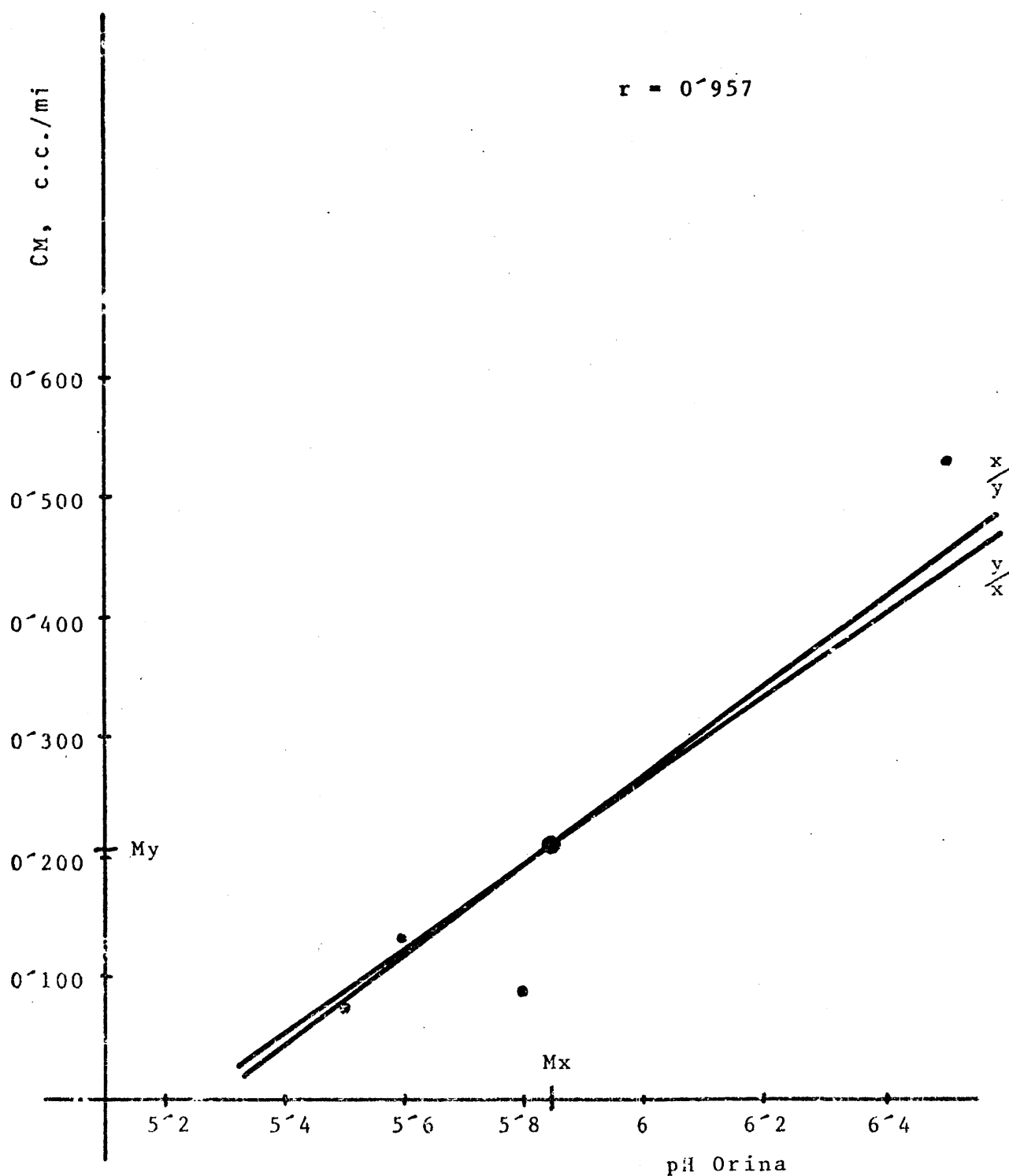
CORRELACION ENTRE LAS TASAS DE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA (DI) EN SANGRE Y EN ORINA.



GRUPO B - SUBGRUPO c

FIG. 37

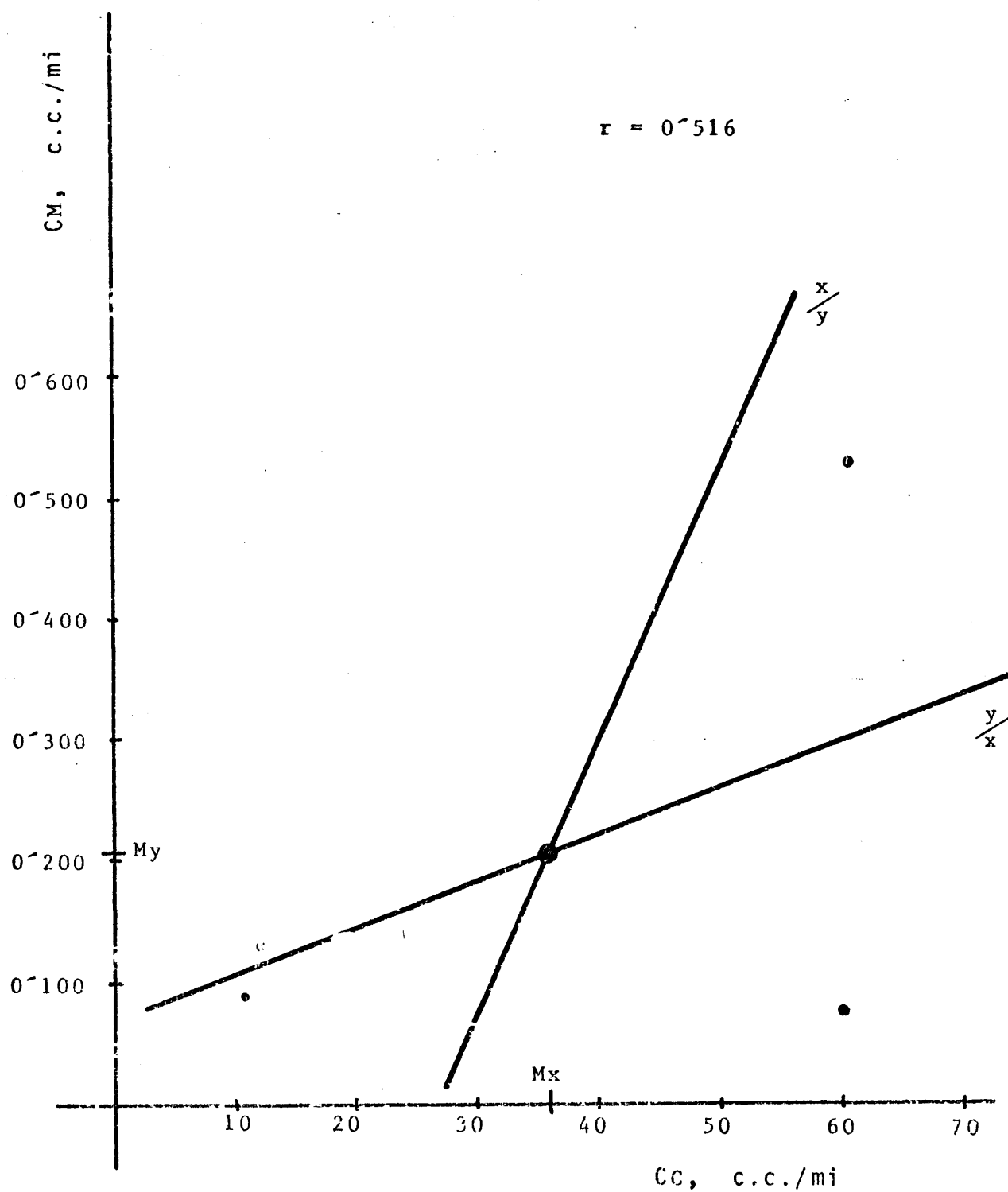
CORRELACION ENTRE LAS TASAS DE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA (Di) EN ORINA Y EL VOLUMEN MINUTO DE ORINA.



GRUPO B - SUBGRUPO c

FIG. 38

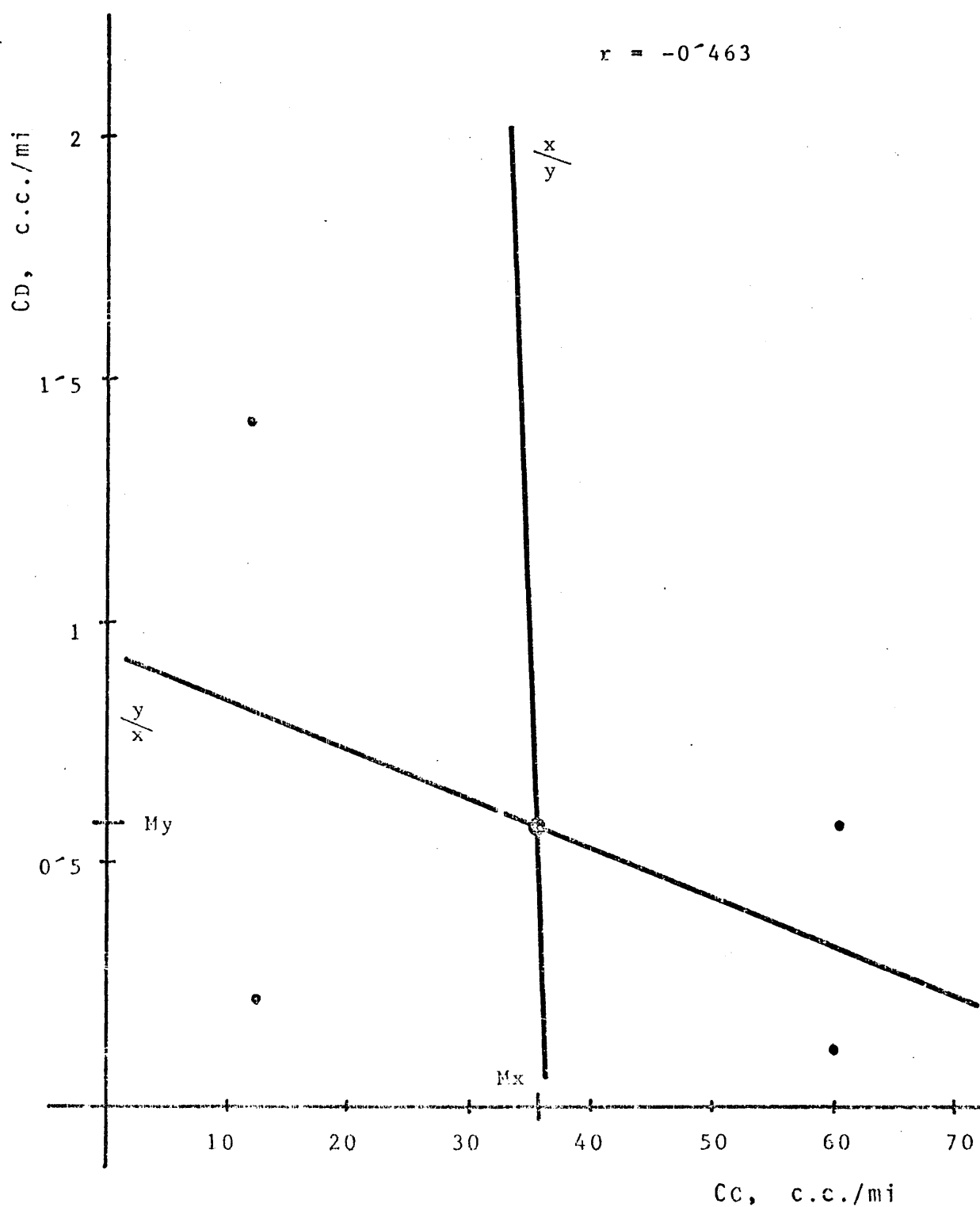
CORRELACION ENTRE EL pH DE LA ORINA Y EL ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA (CM).



GRUPO B - SUBGRUPO c

FIG. 39

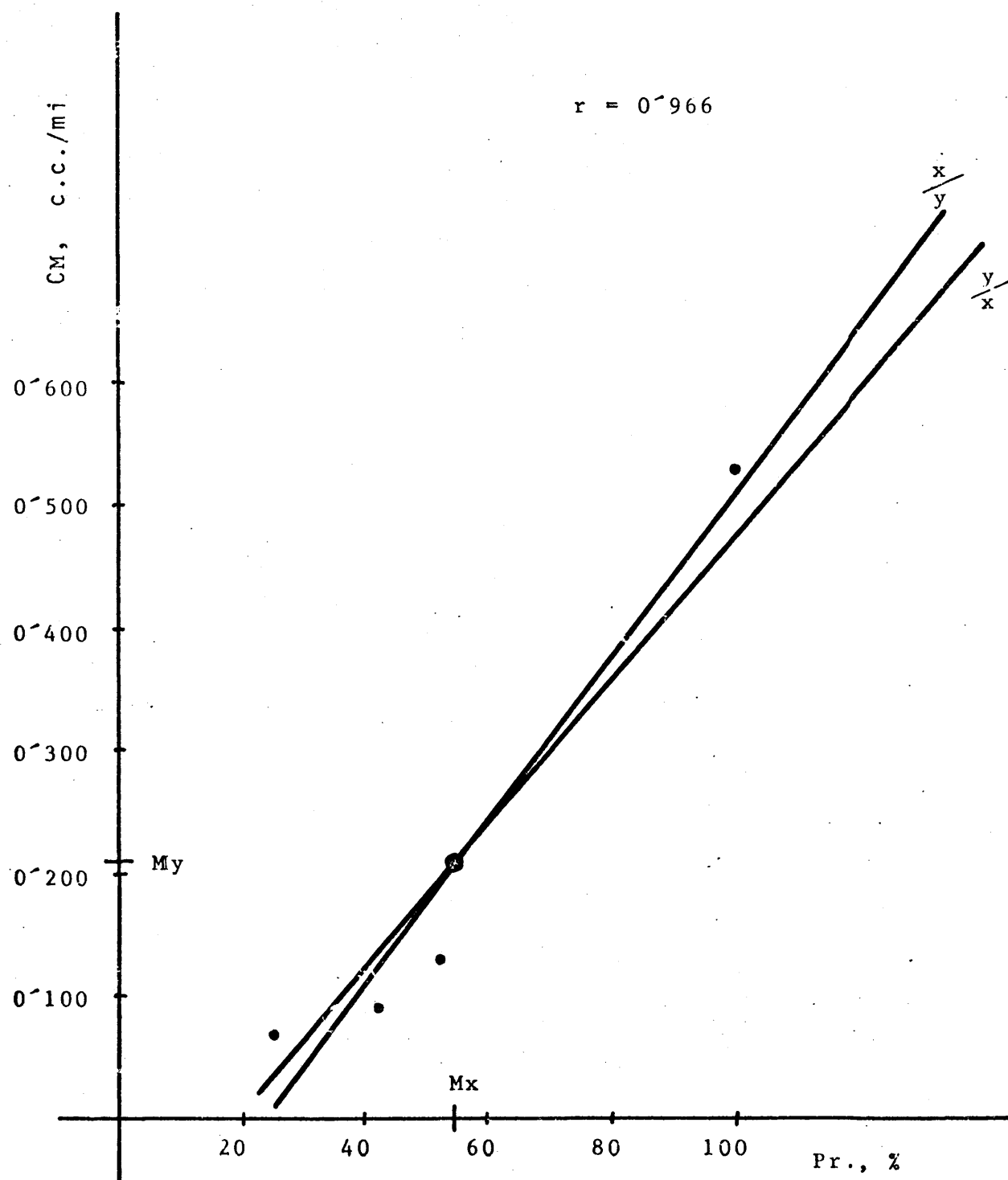
CORRELACION ENTRE ACLARAMIENTO DE CREATININA (Cc) Y  
ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA (Cm)



GRUPO B - SUBGRUPO c

FIG. 40

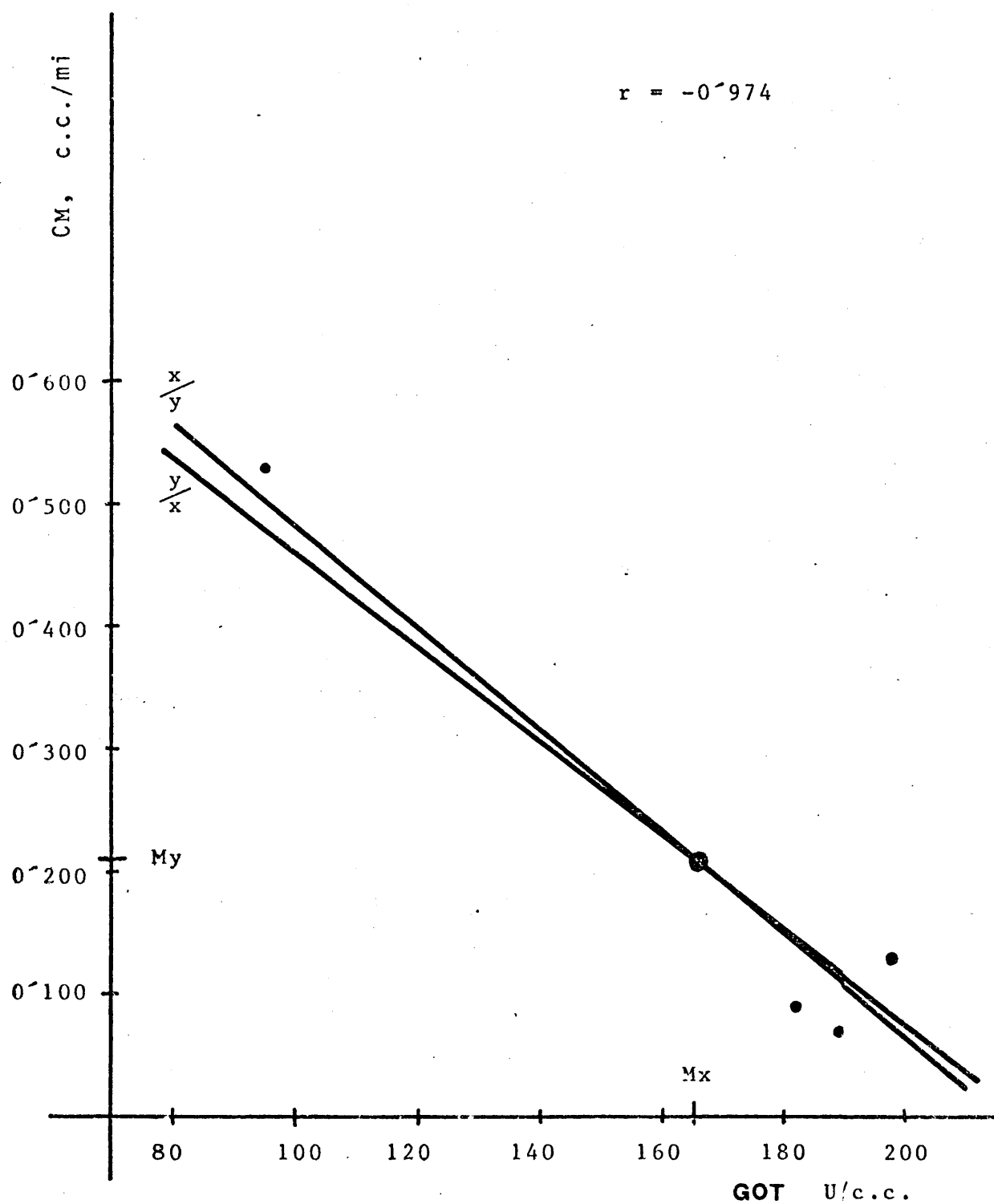
CORRELACION ENTRE ACLARAMIENTO DE CREATININA ( $C_c$ ) Y  
ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA ( $C_d$ )



GRUPO B - SUBGRUPO c

FIG. 41

CORRELACION ENTRE TASA DE PROTROMBINA (Pr) Y ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA (CM)



GRUPO B - SUBGRUPO c

FIG. 42

CORRELACION ENTRE TASA DE G.O.T. Y ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA.

Grupo C.- Ictericas obstructivas.-

Este grupo consta de veinte determinaciones en dieciocho enfermos. Los diagnósticos fueron los siguientes: una obstrucción por quiste hidatídico de hígado; cinco obstrucciones por litiasis biliar; una, por neoplasia distal del colédoco; una, por carcinoma primario de vesícula; una, por probable neoplasia distal de vías biliares (no se pudo realizar intervención, pero los datos clínicos, analíticos, radiológicos, etc. abundaban en tal diagnóstico); dos, por carcinoma de cabeza de páncrea; tres, por colecistitis aguda; una, por colecistitis crónica; un síndrome postcolecistectomía (sin otra causa aparente de la obstrucción: no cálculos, adherencias, etc.); una, por colestasis funcional extrahepática, debida a espesamiento de la bilis en las vías biliares (intensa hemólisis en una anemia hemolítica autoinmune; la ausencia de causa mecánica de otra índole que justifica la obstrucción, fué comprobada por intervención); y finalmente, una obstrucción por colangitis postcolecistectomía, clínicamente muy aparatosa.

Los datos correspondientes a dichos enfermos están reflejados en la tabla VI; los resultados de las determinaciones realizadas, en las tablas XXXI, XXXII, XXXIII y XXXIV.

Resultados.- Hubo un evidente predominio, como en los grupos anteriores, de la bilirrubina monoglucuronizada en sangre, con un promedio de 76,55% y una desviación standard de  $\pm 17,99$ . En orina predominó escasamente la forma diconjugada, con un promedio de 54,85% y una desviación típica de  $\pm 29$ .

La monoglucuronizada en sangre, en relación a los normales estuvo significativamente disminuida ( $p < 0,01$ ), pero no hubo diferencia estadísticamente significativa con los restantes grupos: A, "a", "b" y "c" ( $p > 0,4$ ,  $p > 0,1$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente).

La forma diglucuronizada en orina, respecto a la de las ictericias por hepatopatías agudas, estuvo significativamente disminuida ( $p < 0,05$ ), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas respecto a los restantes grupos: N, A, "b" y "c" ( $p > 0,3$ ,  $p > 0,2$ ,  $p > 0,6$  y  $p > 0,6$ , respectivamente).

Hubo franco predominio de la bilirrubina directa sobre la indirecta, tanto en sangre como en orina.

Así mismo, predominó, como en todos los grupos anteriores, el aclaramiento



de la bilirrubina diglucuronizada sobre el de la monoglucuronizada, con un promedio del primero de 3,50 c.c./mi y una desviación standard de  $\pm 6,33$ . El promedio del aclaramiento de la monoconjugada fué de 0,205 c.c./mi y la desviación típica de  $\pm 0,171$ .

Respecto a los normales, hubo una disminución del aclaramiento, tanto de la mono como de la diconjugada, estadísticamente significativa ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente), pero la diferencia con los restantes grupos A, "a", "b" y "c", no fué estadísticamente significativa ( $p > 0,8$ ,  $p > 0,2$ ,  $p > 0,5$  y  $p > 0,9$ , respectivamente, para el aclaramiento de la monoglucuronizada. Y  $p > 0,6$ ,  $p > 0,9$ ,  $p > 0,9$  y  $p > 0,3$ , respectivamente, para el aclaramiento de la diconjugada).

Correlaciones.- En la tabla XXXV se reflejan algunos coeficientes de correlación de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina y sus aclaramientos, así como de la bilirrubina directa e indirecta, con diversos parámetros, los que pasamos a comentar a continuación.

Tanto la tasa de mono como la de diglucuronizada en orina se correlacionaron mal con las correspondientes tasas en sangre ( $r=0,199$ ), lo que representamos en la figura 43.

También dichas tasas de mono y diconjugada en orina se correlacionaron mal, tanto con el pH de la sangre ( $r=0,321$ ) como con el pH de la orina ( $r=0,413$ ), así como con el volumen/minuto de orina ( $r=0,455$ ).

En cambio, tanto las tasa de bilirrubina total de orina como la directa, se correlacionaron excelentemente con las correspondientes tasas en sangre ( $r=0,957$  y  $0,923$ , respectivamente), figuras 44 y 45; pero la tasa de bilirrubina indirecta en orina se correlacionó escasamente con la tasa correspondiente en sangre ( $r=0,733$ ).

Las tasas de bilirrubina total y directa en orina se correlacionaron moderadamente con el pH de la sangre ( $r=0,832$  y  $0,822$ , respectivamente); y mal con el pH de la orina ( $r=0,177$  y  $0,195$ , respectivamente) y con el volumen/minuto de orina ( $r=0,137$  y  $0,121$ ).

Las correlaciones de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, con diversos parámetros, fueron todas malas:

El aclaramiento de la monoconjugada se correlacionó escasamente con el pH

de la sangre ( $r=0,650$ ) y mal con el pH de la orina ( $r=0,182$ ), figs. 46 y 47. La correlación del aclaramiento de la diconjugada fué mala, tanto para el pH de la sangre como para el de la orina ( $r=0,300$  y  $0,271$ , respectivamente) figs. 48 y 49.

Ambos aclaramientos de las fracciones glucuronizadas se correlacionaron también mal con el volumen minuto orina ( $r=0,058$  y  $0,025$ ) y con el aclaramiento de creatinina ( $r=0,071$  y  $0,043$ ), figs 50 y 51.

Finalmente, los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina se correlacionaron mal con los restantes parámetros en sangre (albúmina, gamma-globulina, protrombina, etc.), como podemos observar en la tabla XXXV. Solo el aclaramiento de la bilirrubina monoglucuronizada guardó moderada correlación con la B.S.P. ( $r=0,729$ ).

Conclusiones de los resultados en el grupo de ictericias obstructivas.-

- 1) Franco predominio en sangre de la bilirrubina monoglucuronizada, con una disminución, respecto a los normales, estadísticamente significativa, pero sin diferencias significativas en relación a los restantes grupos.
- 2) En orina predominó escasamente la bilirrubina diglucuronizada. Respecto a las ictericias por hepatopatías difusas agudas, hubo una disminución de aquella estadísticamente significativa, pero no en relación a los restantes grupos.
- 3) Predominio, como en todos los grupos anteriores, del aclaramiento de la bilirrubina diglucuronizada sobre el de la monoglucuronizada. Respecto a los normales hubo una disminución de ambos aclaramientos estadísticamente significativa, pero las diferencias no fueron significativas comparadas con los restantes grupos.
- 4) Predominio de la bilirrubina directa sobre la indirecta, tanto en sangre como en orina.
- 5) Hubo mala correlación entre las tasas de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina en sangre con las correspondientes tasas en orina.
- 6) Así mismo, hubo mala correlación de dichas tasas en orina con el pH de la sangre, pH de la orina y vol/mi de orina.
- 7) En cambio, las tasas de bilirrubina total y directa en orina, se correlacionaron excelentemente con las correspondientes tasas en sangre. Pero para la bilirrubina indirecta hubo escasa correlación entre sus tasas en sangre y las de orina.

8) Las tasas de bilirrubina total y directa en orina se correlacionaron moderadamente con el pH de la sangre, y mal con el pH de la orina y el volumen/minuto de orina.

9) Los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina se correlacionaron mal con todos los parámetros comparados. Solo hubo escasa correlación del aclaramiento de la monoconjugada con el pH de la sangre y con la B.S.P.

Tabla XXXI

GRUPO C.- <u>ICTERICIAS OBSTRUCTIVAS</u>						
Determinaciones en <u>Sangre</u>						
Caso	Mono	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH
15	45	55	22,20	16,67	5,53	7,43
17	64	36	21,63	14,10	7,53	
19	62	30	9,85	7,31	2,54	
33	64	36	24,50	22,50	2,00	
39	68	32	10,60	7,50	3,10	
50	89	11	5,80	4,75	1,05	
18	70	30	34,22	29,82	4,40	
28	90	10	2,98	2,19	0,79	
45	59	41	15,00	11,90	3,10	
37	66	34	16,50	11,25	5,25	
46	68	32	21,50	17,50	4,00	
32	97	3	1,04	0,94	0,10	
36	98	2	3,63	2,62	1,01	
66	97	3	1,45	0,80	0,65	
51	96	4	1,81	1,35	0,50	
55	66	34	9,53	7,23	2,30	
59	47	53	57,00	39,24	18,76	7,52
63	96	4	7,69	4,30	3,39	7,43
64	95	5	4,45	3,10	1,35	7,47
65	94	6	2,80	1,85	0,95	7,39
$\bar{x}$	76,55	23,45	13,70	10,34	3,41	7,44
S.D.	17,99	17,99	13,32	10,45	4,11	0,04
E.T.	4,02	4,02	3,09	2,33	0,92	0,02
C.V.	23,50	76,71	100,8	101,04	120,45	0,66

Tabla XXXII

GRUPO.- <u>ICTERICIAS OBSTRUCTIVAS</u>									
Determinaciones en <u>Orina</u>									
Caso	Mono	Di	B.T.	B.D.	B.I.	pH	Dens.	Alb.	Vol./ml
15	8	92	12,30	10,00	2,30	6,0	1024	(-)	0,44
17	26	74	19,14	18,00	1,14	8,0	1010		0,36
19	98	2	1,00	0,80	0,20	5,0	1015		1,30
33	34	66	19,50	17,10	2,40	6,0	1016		0,45
39	46	54	7,15	5,40	1,75	6,0	1020		0,37
50	62	38	3,08	2,88	0,20	6,5	1018		0,72
18	27	73	22,50	20,10	2,40	6,2	1015		1,01
28	53	47	1,15	0,83	0,32	6,0	1020		0,90
45	44	56	2,39	1,77	0,62	6,2	1018		0,54
37	18	82	4,50	3,63	0,87	5,5	1010		0,63
46	36	64	12,50	9,10	3,40	5,6	1033	(-)	0,56
32	96	4	1,87	1,77	0,10	5,6	1026		0,41
36	43	57	2,19	1,66	0,53	6,0	1013		0,55
66	8	92	1,10	0,90	0,20	6,5	1014		0,73
51	61	39	0,80	0,60	0,20	5,6	1018		1,10
55	96	4	1,35	0,90	0,45	5,5	1004		1,15
59	23	77	45,60	41,50	4,10	6,0	1015		0,90
63	4	96	5,20	3,85	1,35	7,0	1041		0,72
64	46	54	2,25	1,45	0,80	5,6	1021		0,69
65	74	26	10,60	0,40	0,20	7,0	1012		1,31
X	45,15	54,85	8,30	7,13	1,17	6,09	1018	0,0	0,74
S.D.	29,00	29,00	11,22	10,23	1,17	0,67	8,28	0,0	0,30
E.T.	6,48	6,48	2,50	2,28	0,26	0,15	1,85	0,0	0,06
C.V.	64,24	52,88	135,05	143,43	99,92	11,02	0,81	777,00	40,88

Tabla XXXIII

GRUPO C.- <u>ICTERICIAS OBSTRUCTIVAS</u>				
Caso	Aclar. de Mono	Aclar. de Di	Cociente $\frac{Di}{Mono}$	Aclar. Creat.
15	0,030	0,250	8,30	69,90
17	0,180	0,940	5,20	54,80
19	0,190	0,007	0,03	27,30
33	0,180	0,620	3,44	74,00
39	0,180	0,440	2,44	72,00
50	0,300	1,520	5,06	81,00
18	0,260	1,650	6,34	51,71
28	0,200	1,600	8,00	78,00
45	0,050	0,110	2,20	57,00
37	0,050	0,490	9,80	110,60
46	0,150	0,590	3,93	168,00
32	0,770	1,040	1,35	79,40
36	0,150	9,930	63,00	153,00
66	0,060	25,000	416,00	84,00
51	0,310	4,290	13,83	135,00
55	0,200	0,016	0,08	96,60
59	0,460	1,370	2,97	90,00
63	0,020	15,480	774,00	43,20
64	0,150	3,510	23,40	39,67
65	0,220	1,220	5,54	76,60
$\bar{X}$	0,20	3,53	67,74	82,18
S.D.	0,17	6,33	189,93	36,46
E.T.	0,03	1,41	42,47	3,15
C.V.	82,99	180,82	280,37	44,36

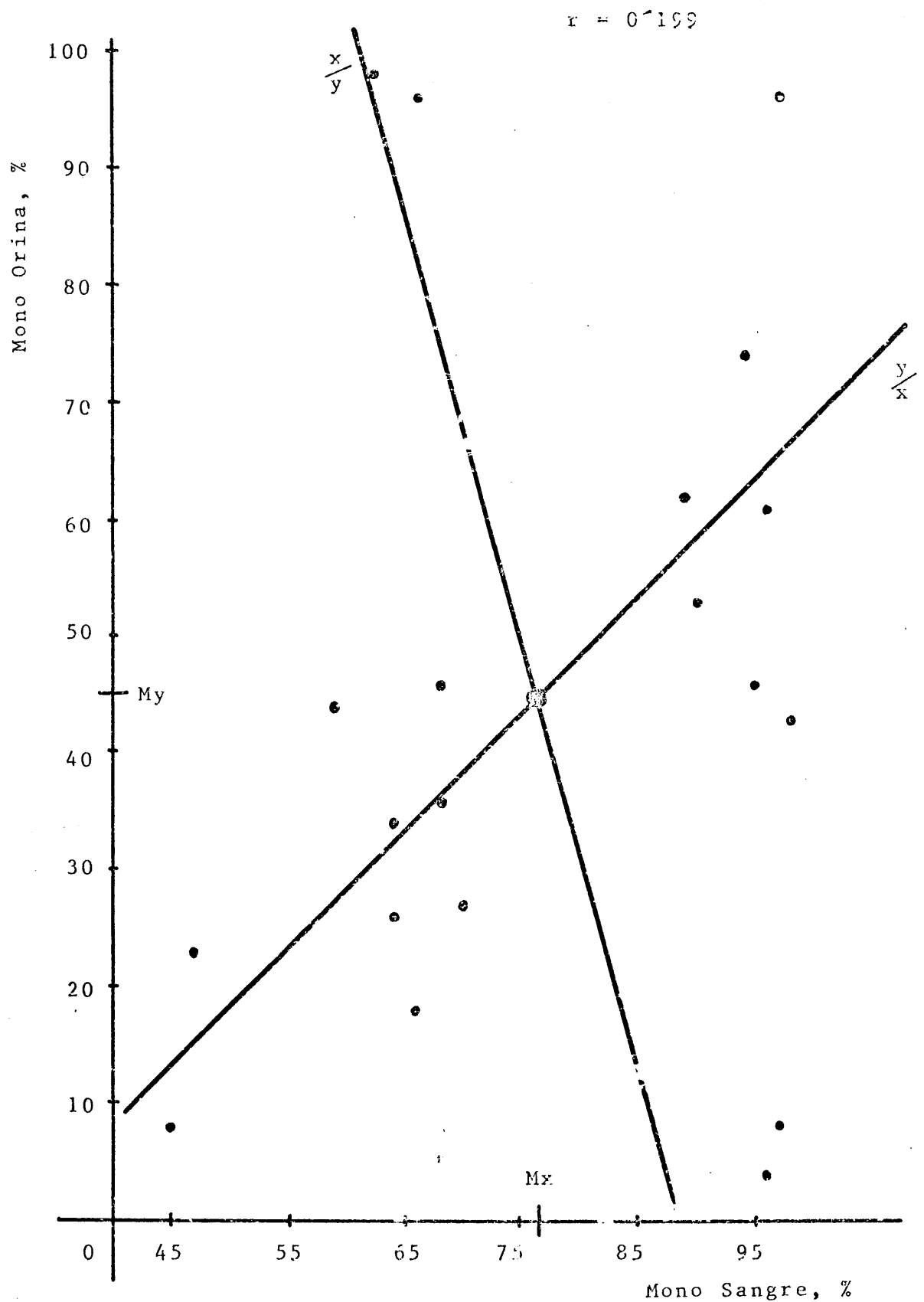
Tabla XXXIV

GRUPO C.- ICTERICIAS OBSTRUCTIVAS								
Determinaciones en Sangre								
Caso	Alb.	G-glob.	Protr.	Bromo	GOT	GPT	F.Alcal	L.A.P.
15	3,80		66		550	280	22,08	96,01
17								
19	3,08	0,96	86	8,00	42	31	11,51	22,89
33	2,56	0,90	100		108	126	18,20	
39	3,09	1,46	100		59	30	19,79	25,20
50	4,32	1,21	76		320	460		34,60
18	3,59	0,89	47		420	180	11,02	
28	2,70	1,27	86		63	50	12,40	38,90
45								
37	3,26	1,77	30		59	45	7,72	33,80
46								
32	3,67	1,53	76		50	25	11,97	
36	3,09	1,35	100	25,00	67	50	14,26	
66								
51	3,85	1,26	76	5,00	189	126	3,50	20,80
55			66		95	91		
59	3,60	1,30	100		820	560	14,50	
63	2,88	1,21	91		150	130	10,60	
64	2,90	1,21	91		150	130	10,60	
65	2,37	2,30	66	19,20	40	23	15,50	29,70
X	3,25	1,33	78,56	14,30	198,87	146,37	13,11	57,73
S.D.	0,54	0,36	20,17	9,39	222,64	158,60	4,82	24,35
E.T.	0,14	0,09	5,04	4,69	53,65	39,65	1,29	8,61
C.V.	16,67	27,66	25,68	65,68	111,95	108,35	36,78	64,53

Tabla XXXV

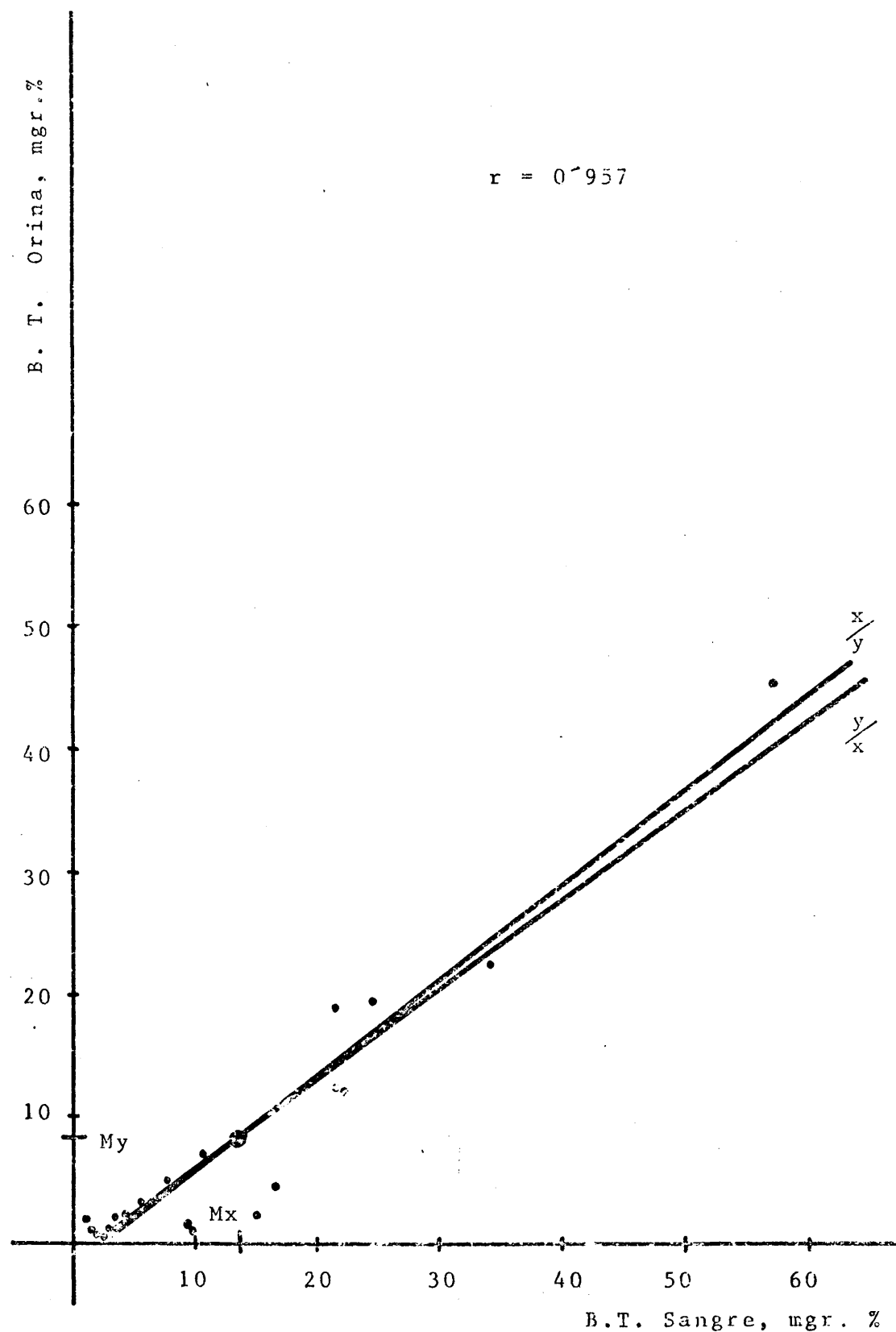
GRUPO C.- ICTERICIAS OBSTRUCTIVAS											
COEFICIENTES DE CORRELACION											
	MO-S	DI-S	BT-S	BD-S	BI-S	pH-S	pH-O	VOL/M	C <sub>M</sub>	C <sub>D</sub>	C <sub>C</sub>
MO-O	0,199					0,321	0,413	0,455	0,531		
DI-O		0,199								0,430	
BT-O			0,957			0,832	0,177	0,137			0,032
BD-O				0,923		0,822	0,195	0,121		0,208	0,052
BI-O					0,733	0,857	0,010	0,253			0,144
DEN-O									0,015	0,201	
C <sub>M</sub>	0,168					0,650	0,162	0,058			0,071
C <sub>D</sub>		0,536		0,339		0,300	0,271	0,025			0,043
C <sub>C</sub>						0,108	0,241	0,088			
ALBU.									0,366	0,160	
G-GLO									0,056	0,097	
PROT.									0,109	0,316	
B.S.P									0,729	0,579	
GOT									0,137	0,110	
G.P.T									0,167	0,076	
F-ALC									0,151	0,263	
L.A.P									0,648	0,335	





GRUPO C  
FIG. 43

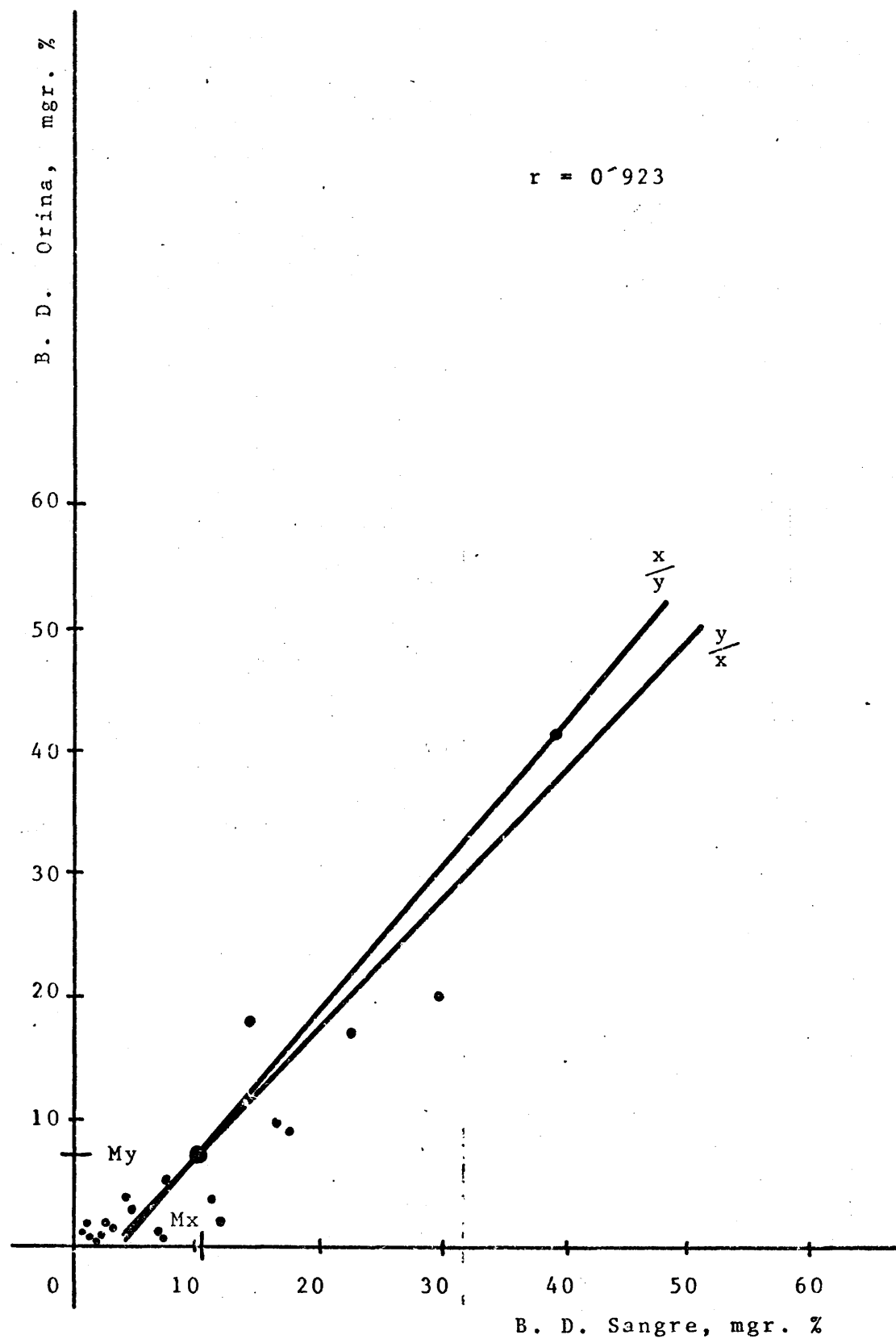
CORRELACION ENTRE LAS TASAS DE BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA EN SANGRE Y EN ORINA.



GRUPO C

FIG. 44

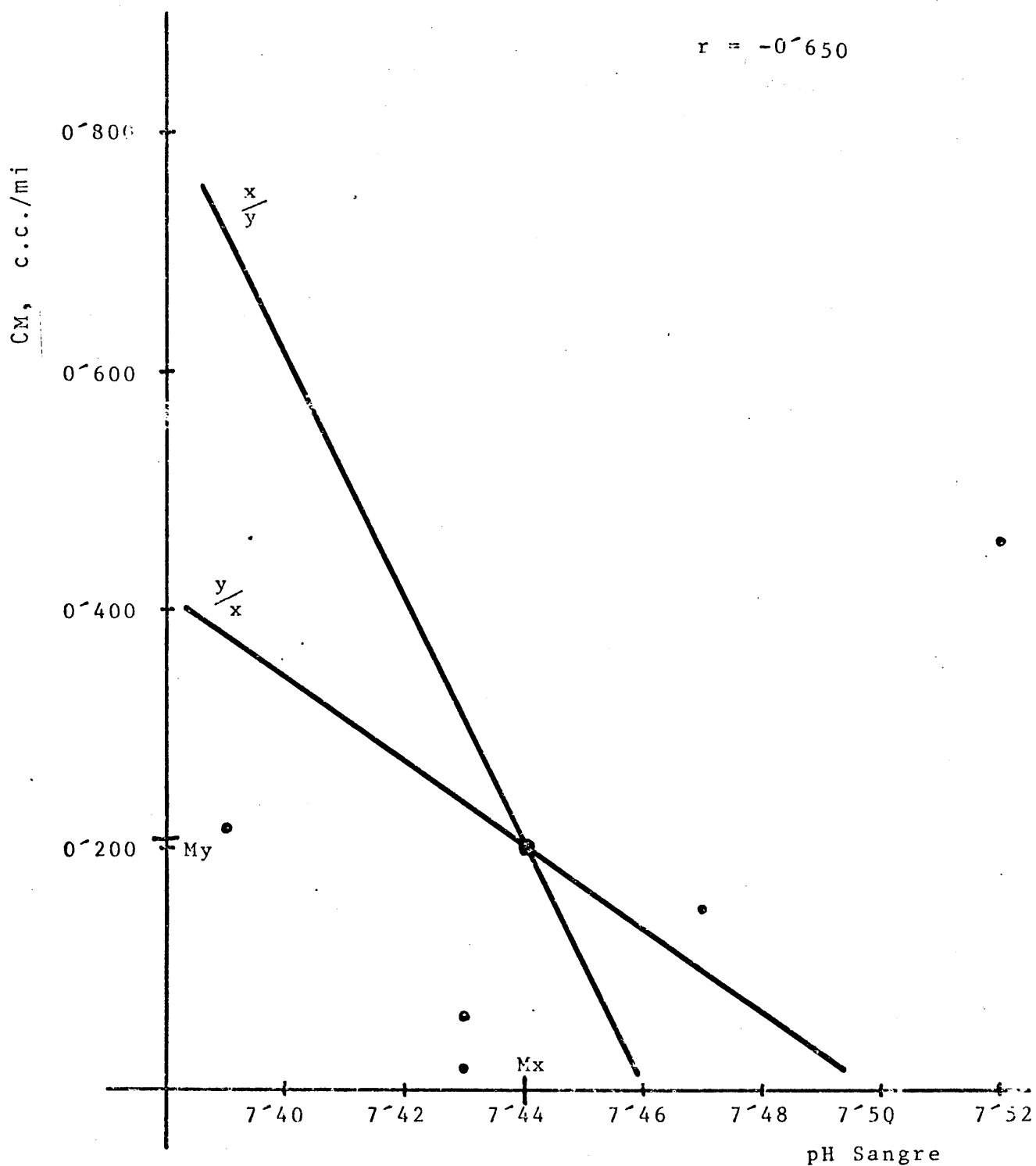
CORRELACION ENTRE LAS TASAS DE BILIRRUBINA TOTAL EN SANGRE Y EN ORINA.



GRUPO C

FIG. 45

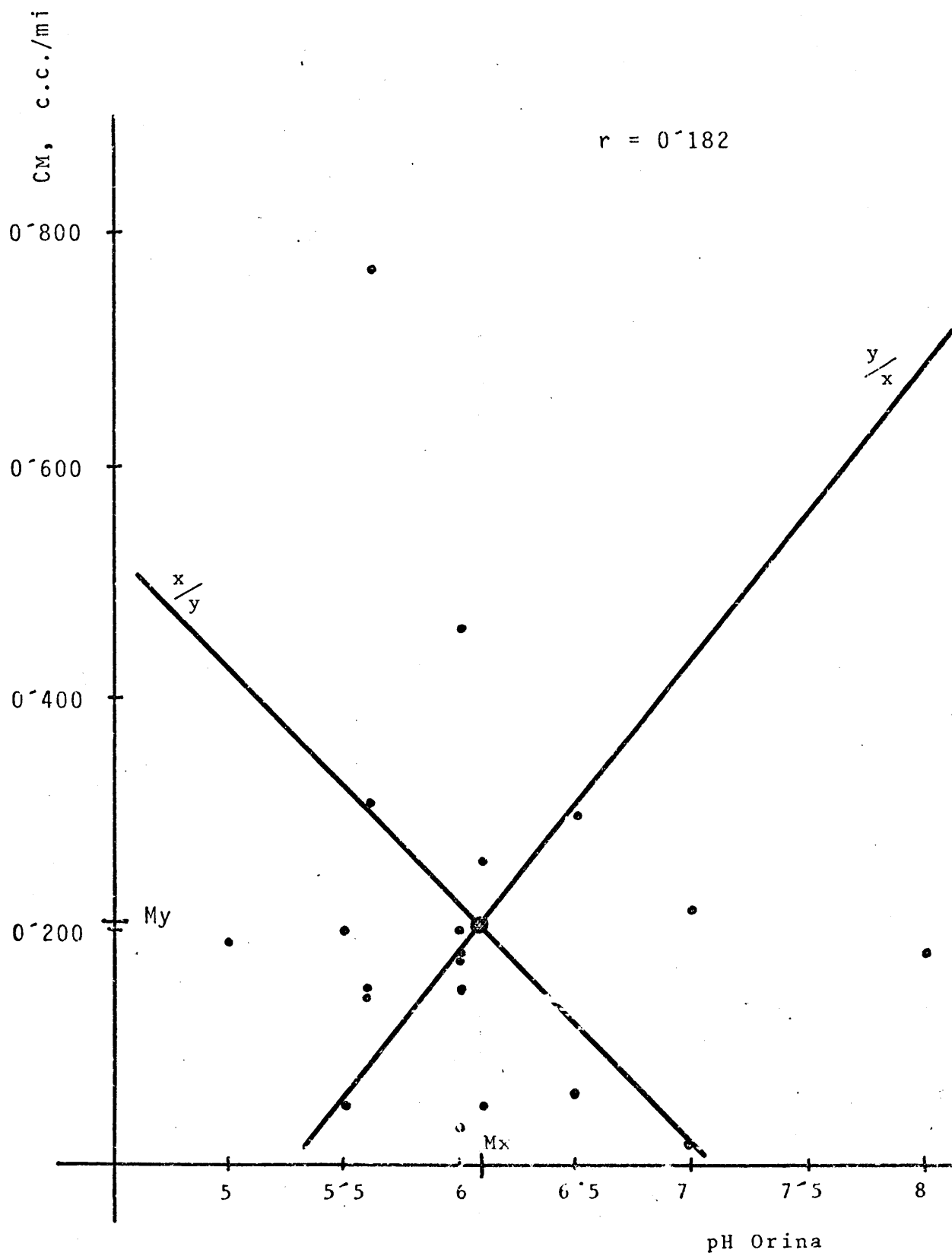
CORRELACION ENTRE BILIRRUBINA DIRECTA (B.D.) EN SANGRE Y EN ORINA.



GRUPO C

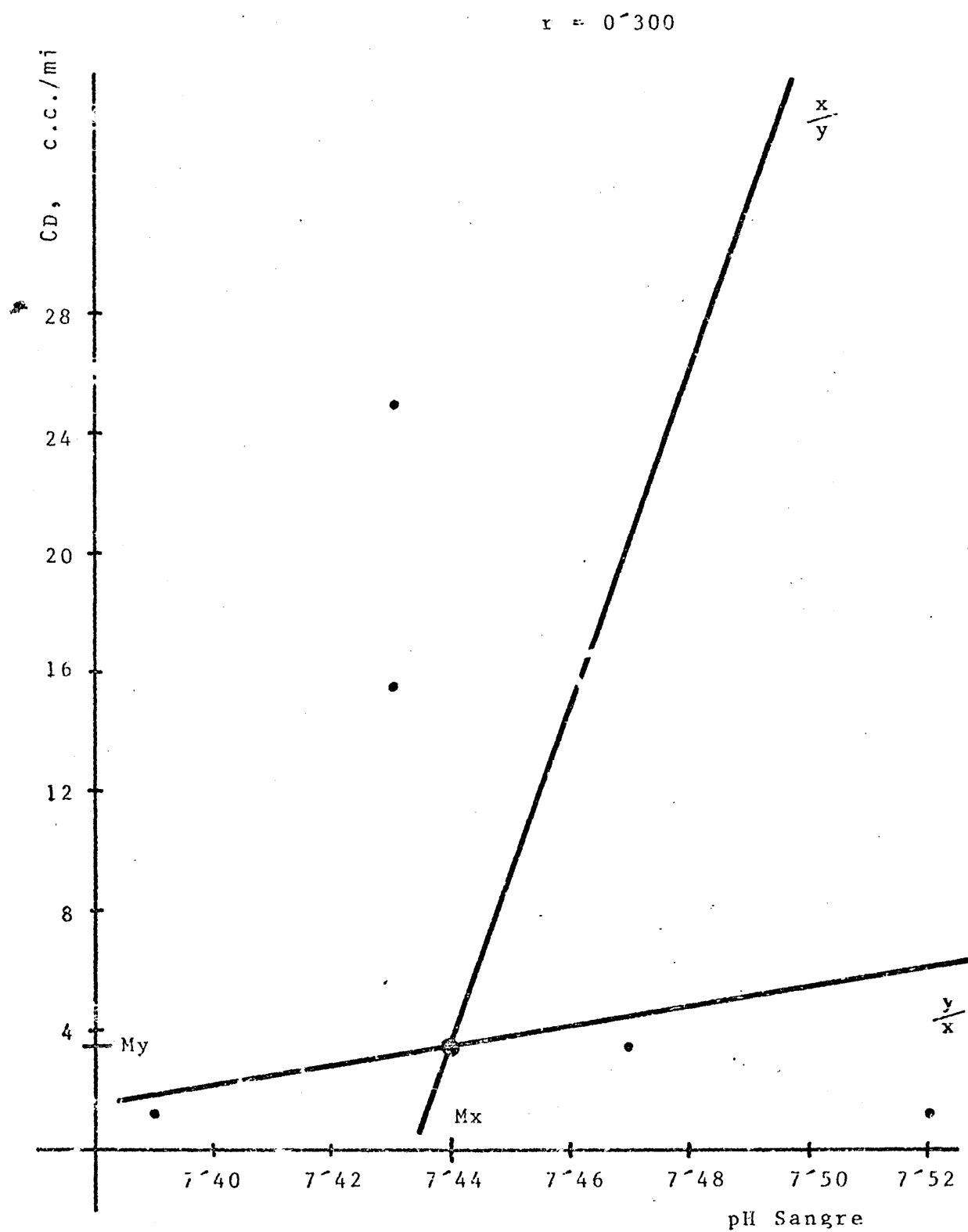
FIG. 46

CORRELACION ENTRE pH DE LA SANGRE Y ACLARAMIENTO DE  
BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA (CM)



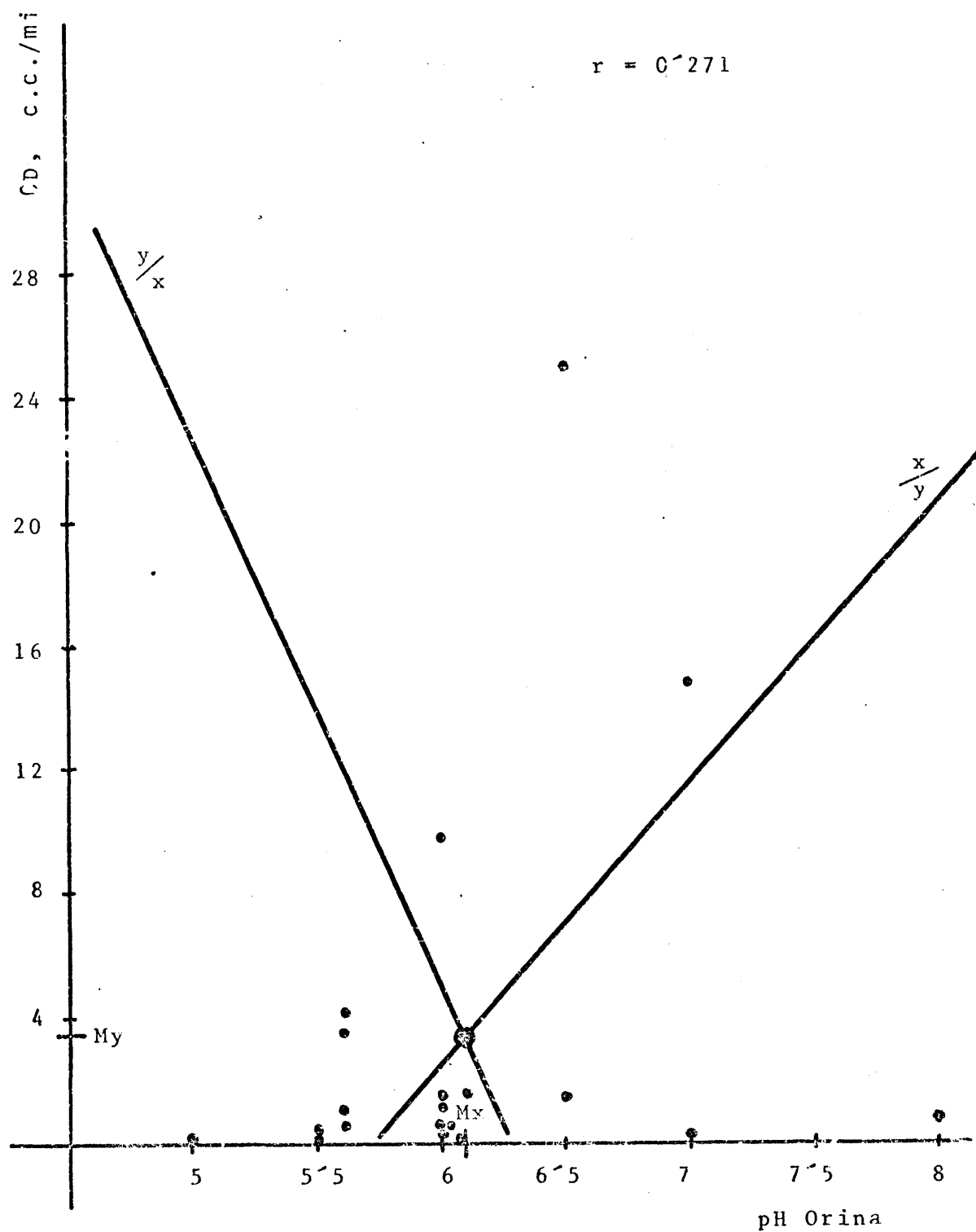
GRUPO C  
FIG. 47

CORRELACION ENTRE ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA (CM) Y pH DE LA ORINA.



GRUPO C  
FIG. 48

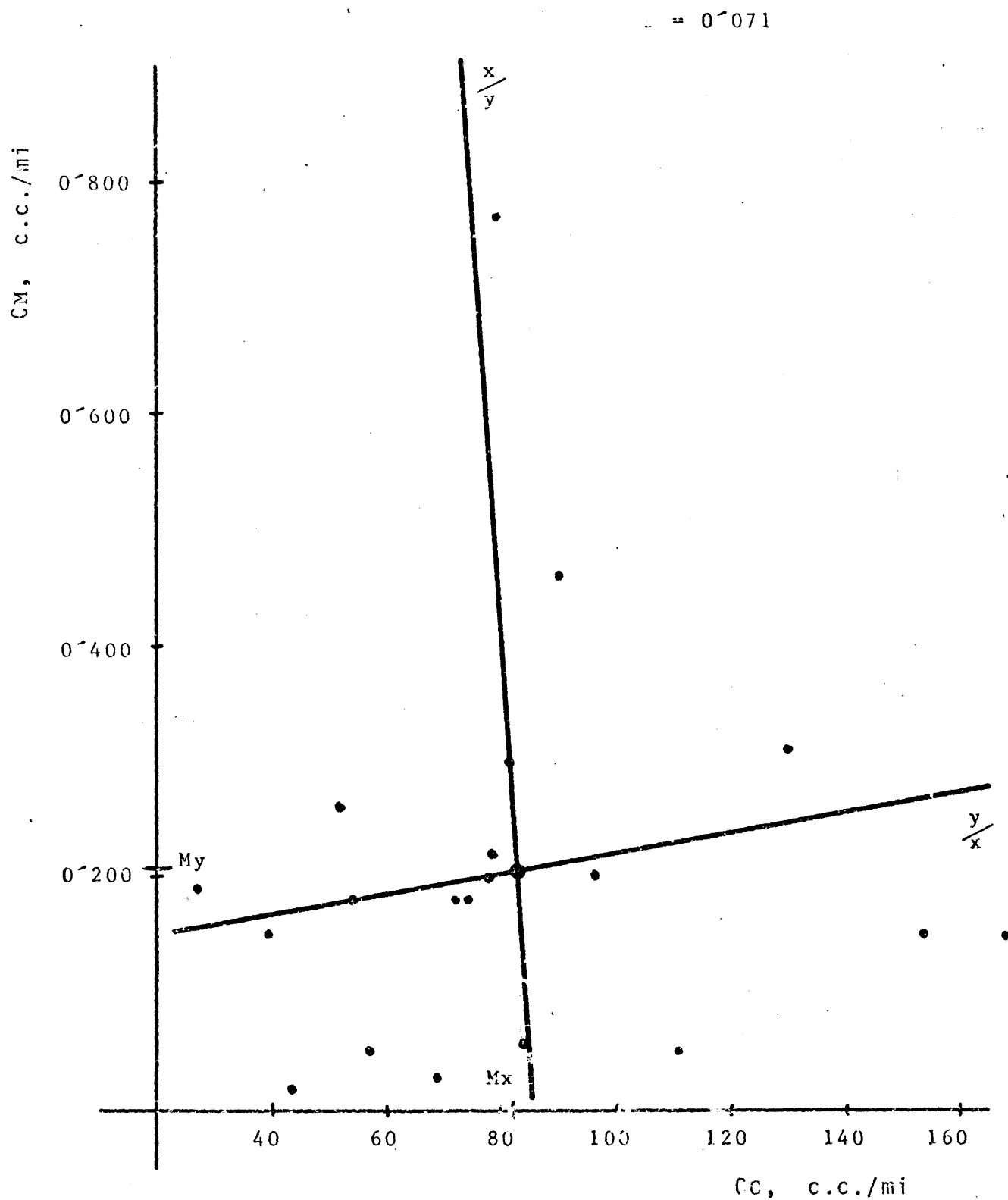
CORRELACION ENTRE pH DE LA SANGRE Y ACLARAMIENTO DE  
BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA (CD)



GRUPO C

FIG. 49

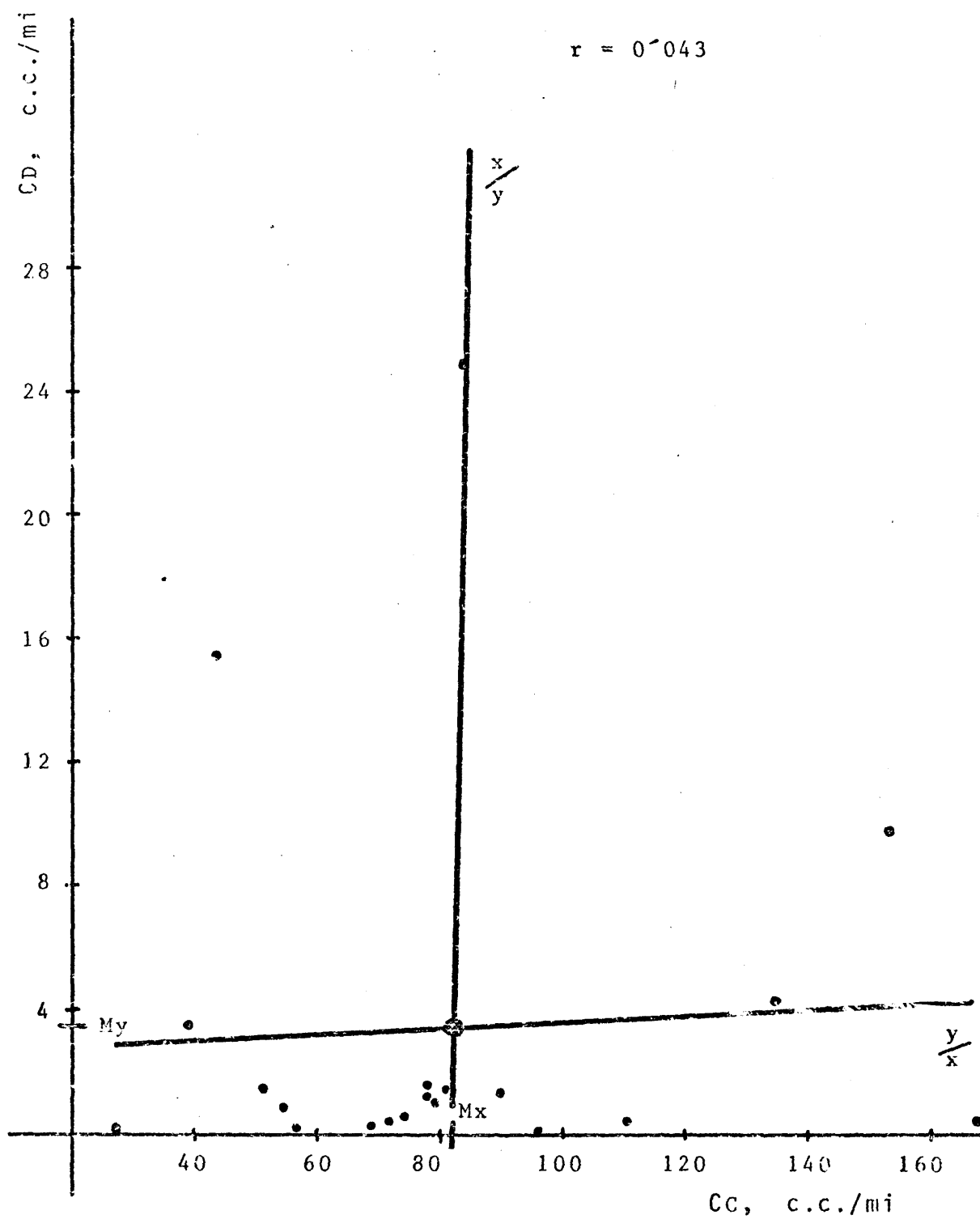
CORRELACION ENTRE pH DE LA ORINA Y ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA (CD)



GRUPO C  
FIG. 50

CORRELACION ENTRE ACLARAMIENTO DE CREATININA (Cc) Y  
ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA (CM)





GRUPO C

FIG. 51

CORRELACION ENTRE ACLARAMIENTO DE CREATININA (Cc) Y  
ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA (Cd)

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Para comentar los resultados de nuestras investigaciones y compararlos, en algunos aspectos, con los de otros autores, así como obtener conclusiones más útiles, tanto de aquéllos como de los que ofrezcan una matiz más novedoso, hemos creído conveniente remontarnos a la revisión bibliográfica del metabolismo de la bilirrubina, en especial a la sección sobre "Excreción renal de la bilirrubina", estableciendo la discusión por apartados, de una forma similar a como allí lo hicimos.

### 1) Niveles séricos de bilirrubina. Umbral renal de bilirrubina.

Vimos en este primer apartado que, aunque algunos autores (With, Halasz, etc.) encontraron dependencia de la intensidad de la bilirrubinuria con la tasa del pigmento en sangre, otros autores (Barc, etc.) concluían que la cantidad de bilirrubina en orina no dependía, en modo alguno, de su cantidad en sangre.

Como resultado de nuestras investigaciones, en la tabla XXXVI podemos ver los promedios de las tasas de bilirrubina en sangre y en orina, en mgr%; y en la tabla XXXVII sus coeficientes de correlación, en los diversos grupos de ictericias estudiados.

De la observación de la primera tabla mencionada podemos deducir que hay una cierta proporcionalidad entre las tasas de bilirrubina total en sangre y en orina, aumentando la bilirrubinuria según lo hace la bilirrubinemia. Esto en términos amplios, ya que de la observación de la segunda tabla se deduce que no existe correlación, ni lineal ni constante, entre las tasas de bilirrubina total en sangre y las correspondientes en orina. Solo los grupos de ictericia por hemólisis, por hepatopatías crónicas y por obstrucción biliar, mantuvieron una más estrecha correlación. En la fig. 52 se puede apreciar mejor lo que acabamos de decir.

Quisimos ver si esta ausencia de correlación lineal, hallada por algunos autores entre bilirrubinemia total y bilirrubinuria total, en los grupos por hepatopatías agudas y hepatopatías tumorales se debía a un déficit de la función renal y reparamos en algunos parámetros de ésta (aclaramiento de creatinina, densidad, vol/mi, pH etc.), observando que solo el grupo de las hepatopatías tumorales presentaban déficit funcional, con aclaramiento de creatinina bajo, hipostenuria, etc., pero el grupo de hepatopatías difusas agudas mantenía una buena función renal, según se deduce de los datos reflejados en la tabla XXXVI, por lo que la ausencia de correlación en dicho grupo entre bilirrubinemia y bilirrubinuria no podía ser explicada por un mecanismo renal.

Pretendimos explicarlo, entonces, por una alteración de la función hepática, citado por algunos autores, como veremos más adelante. En el grupo "c" se encontraba, en términos generales, algo deteriorada aquélla, pero en el grupo "n", la función síntesis (protrombina, albúmina plasmática), la función de conjugación (bromo) y los signos analíticos de colestasis, estaban bastante respetados, observándose solo signos analíticos de citolisis (transaminasas), siendo poco verosímil poder explicar por élla la ausencia de correlación de bilirrubinemia y bilirrubinuria, por cuanto en dicho grupo, los coeficientes de correlación, como veremos después, de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, tanto con la GOT como con la GPT, fueron malos.

Por tanto, hemos de concluir que, aun cuando existe una dependencia de la bilirrubinuria con la bilirrubinemia, en modo alguno esta correlación es lineal ni constante, pronunciándonos, en este aspecto en el mismo sentir de Barac.

En relación al umbral renal de bilirrubina, en nuestra opinión, y a la vista de nuestros resultados, aquél es muy bajo, ya que encontramos bilirrubina en orina aún con niveles de ésta en sangre por debajo de 1 mgr%. Esta conclusión es totalmente acorde con la emitida por Rabinowitch hace ya muchos años, quien encontró el pigmento en orina aún a concentraciones séricas normales.

## 2) Estado de conjugación de la bilirrubina.-

Todos los autores están de acuerdo en que la bilirrubina predominante en orina es la directa, incluso para algunos solo existe en esta forma. Respecto a las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, solo escasos investigadores se han interesado por su eliminación renal (Ali Mam. Diaz-Kuncio, Fulop y Brazaau,

Wallace y Owen, etc) por lo que poco es lo que se sabe acerca de su mecanismo de excreción urinaria. No obstante, todos ellos concluyen en que la bilirrubina diglucuronizada es el pigmento dominante en orina.

En este sentido, el resultado de nuestras investigaciones es concordante con la mayoría de los autores, encontrando también un evidente predominio de la bilirrubina diglucuronizada sobre la monoglucuronizada en orina, en todos los grupos, como podemos ver en la tabla XXXVI, con la excepción del grupo "c" (hepatopatías tumorales) en que hubo un ligero predominio de la monoglucuronizada en dicho medio, diferencia que, como ya dijimos en su lugar, no fue estadísticamente significativa. Este grupo fue el que presentó mayor deterioro de la función renal y tal vez ello afecte a la eliminación de la forma diconjugada más a la monoconjugada.

Dado que la diferencia fundamental entre un tipo y otro de bilirrubina es su distinta solubilidad, siendo el pigmento II el más soluble de todos, es muy posible que radique en dicha propiedad el diferente comportamiento en la eliminación renal. En este sentido observamos en los grupos A, "b", "c" y C una aceptable correlación entre las tasas de bilirrubina directa en sangre y las mismas en orina (fig. 53) siendo peores dichas correlaciones con la bilirrubina indirecta (insoluble). Sin embargo, cuando comparamos las tasas de bilirrubina diglucuronizadas (de máxima solubilidad) en sangre con las correspondientes en orina (fig. 54) vemos que todas las correlaciones son malas (excepto el grupo "c", como acabamos de comentar), lo cual nos aleja bastante de la idea tan simple de que el grado de solubilidad sea el principal factor determinante de la distinta eliminación urinaria de uno y otro tipo de pigmento. Al menos, otros factores deben también jugar un papel importante, ya que todo no es justificable atendiendo solo dicha propiedad.

En todos nuestros grupos, aunque en cantidades muy pequeñas, encontramos bilirrubina indirecta en orina, la cual guardó también una cierta dependencia con la correspondiente tasa en sangre, pero, con la excepción del grupo A, todas las correlaciones fueron malas. Como acontecía con la presencia de bilirrubina indirecta en la bilis, según comentábamos en la revisión bibliográfica, no es fácil explicar esta presencia de bilirrubina indirecta en la orina. Tal vez se deba invocar, como se hizo allí, un mecanismo de deconjugación renal de la bilirrubina conjugada filtrada por el glomérulo, ya que, por numerosos trabajos citados, la



tablecimos correlaciones con los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina (tabla XXXVII). De resultados de ellos podemos resumir:

a) El aclaramiento de la fracción monoglucuronizada fué bastante similar en todos los grupos (fig. 59). Tal vez este hallazgo pueda justificarse si admitimos que normalmente (o principalmente) la monoglucuronización de la bilirrubina es extrahepática, como comentábamos en nuestra revisión bibliográfica, por lo que el estado de la función hepática ejercía poca o ninguna influencia sobre la eliminación renal de aquella forma del pigmento. No obstante, en el grupo de hepatopatías tumorales ("c") encontramos dos hallazgos a nuestro juicio bastante significativos: el aclaramiento de la mono se correlacionó excelentemente y de forma directa con la protrombina (fig. 41) y así mismo la correlación fué estrecha con las transaminasas (tabla XXX) pero aquí de tipo inverso (fig. 42); es decir: que a mayor capacidad de síntesis del hígado, mejor eliminación renal del pigmento, y a mayor destrucción del parénquima hepático (citólisis) menor eliminación renal del mismo. También hubo una moderada correlación del aclaramiento de la monoglucuronizada con la bromo en los grupos de hepatopatías agudas e ictericias obstructivas.

b) El aclaramiento de la fracción diglucuronizada estuvo más alto en aquellos grupos con mejor conservación de la función hepática (fig. 59): los valores más elevados fueron para el grupo de ictericias hemolíticas, después el de hepatopatías agudas, seguido de ictericias obstructivas y hepatopatías crónicas, siendo los valores más bajos para el grupo de hepatopatías tumorales. Sin embargo, estas diferencias, como referimos en su momento, no fueron estadísticamente significativas de unos grupos a otros. La mayor disminución del aclaramiento de la diconjugada en las hepatopatías tumorales frente a las hepatopatías crónicas, debe interpretarse como consecuencia de una gran destrucción del parénquima noble del órgano por la gran extensión del tumor y su coexistencia, en algunos enfermos, con cirrosis hepáticas, sumandose ambas entidades clínicas. A pesar de esta cierta dependencia del aclaramiento la glucuronizada con el estado de la función hepática, las correlaciones con diversos parámetros de aquélla no fueron, en general buenos, lo que también justificaba la ausencia de significación estadística de esa diferencia del grado de aclaramiento en los diversos grupos. Hubo algunos coeficientes buenos aislados: así, se correlacionó bien con la

albúmina plasmática en el grupo de ictericias hemolíticas, aunque esta correlación fué de tipo inverso (fig. 21) quizá indicando una mayor retención en sangre del pigmento unido a la albúmina. También se correlacionó bien con la bromo, en el grupo de hepatopatías agudas, siendo esta correlación de tipo directo (fig. 26), con significación estadística aceptable según expusimos: es decir, a mayor retención de la bromo, mayor eliminación renal del pigmento. Todos los demás correlaciones fueron escasas o malas.

A la vista de estos resultados parece que debemos concluir en que el estado de la función hepática no influye, aparentemente, la eliminación renal del pigmento I. En cuanto a la eliminación del pigmento II, la influencia es solo valorable cuando hay un gran deterioro del órgano, en donde se produce una manifiesta disminución del aclaramiento de la bilirrubina diglucuronizada, como ocurrió en el grupo de hepatopatías tumorales.

#### 4) Unión protéica de la bilirrubina. Dializabilidad y disociabilidad de la misma.

Ya expusimos, al hablar de la excreción renal de la bilirrubina, que la bilirrubinuria no se acompaña normalmente de albuminuria, aún cuando aquélla fuese muy intensa. Por tanto, debemos inferir que tiene que suceder una de estas dos cosas: a) O la bilirrubina se disocia de la albúmina, previamente a su eliminación renal. b) O bien existe bilirrubina "libre" en plasma, que sería la fuente de la bilirrubina urinaria. Ahora bien, dada la escasa solubilidad de la bilirrubina pH fisiológico y su gran habilidad por la albúmina, la mayoría de los autores, entre ellos Sarac, no admiten la existencia de bilirrubina "libre", al menos en cantidad suficiente para explicar la bilirrubinuria a veces tan intensa de algunos enfermos.

Fulop y col. encontraron que la bilirrubina es ligeramente dializable del plasma de sujetos ictericos con ictericia, y no dializable de los que presentaban ictericia, infiriendo la existencia de bilirrubina libre. Insistimos que las cantidades dializadas de bilirrubina eran escasas y no justificaban la cantidad de bilirrubina presente en la orina. Por otro lado, Cameron y col., administrando bilirrubina C-<sup>14</sup> a niños con atresia biliar, recuperaron la mayor parte del pigmento en la orina, cuando presumiblemente solo escasas cantidades podían encontrarse en dicho medio. Por tanto, es preciso admitir una unión de la bilirru-

bina plasmática a la albúmina, que se excindiría previamente a la eliminación renal del pigmento. Dicha unión es más laxa para la bilirrubina conjugada: este hecho es de gran importancia, a nuestro juicio, y ayudaría a explicar, en parte al menos, la mayor habilidad de la bilirrubina conjugada para ser eliminada por el riñón.

En nuestras investigaciones, no encontramos albúmina en orina en ninguno de los pacientes estudiados, excepto en el grupo de hepatopatías difusas agudas (tabla XXXVI), pero en cantidad tan exigua que no justificaba una dependencia de la bilirrubina eliminada por el riñón, ya que otros grupos, con coluria más intensa, no presentaron albuminuria. Y en ese único grupo en que se detectó albuminuria, su correlación con el aclaramiento de las fracciones glucuronizadas fue escasa o mala (tabla XXXVII).

En cuanto a la albúmina plasmática, ya dijimos en el apartado anterior la ausencia de correlación de aquella con los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, si exceptuamos el de la forma diglucuronizada en el grupo de ictericias hemolíticas.

Desconocemos la forma y lugar de esta separación de la bilirrubina de la albúmina antes de su eliminación urinaria, pero es lógico que tenga lugar en el propio riñón, ya que en el plasma toda ella permanece unida a la albúmina, como queda dicho. Precisamente, basándose en este hecho, han sido numerosas las publicaciones realizadas en un intento de determinar el mecanismo de la excreción renal de la bilirrubina: si este tenía lugar por filtración glomerular (lo que exige una previa disociación de la albúmina, aparentemente de tipo pasivo) o por secreción tubular (de carácter activo, en el que hipotéticamente la célula del epitelio tubular disociaría la albúmina, excretando solamente el pigmento). Pero esto lo veremos mejor en el apartado siguiente.

Podemos concluir, por tanto, en que la bilirrubinuria no se acompaña de albuminuria, lo que puede ser debido a la existencia en plasma de bilirrubina "libre", poco probable, por las razones antes apuntadas, o más verosimilmente, a una disociación de la albúmina previamente a la eliminación renal del pigmento.

##### 5) Función renal. Diuresis.-

Ya expusimos ampliamente, en este mismo apartado de la revisión bibliográfica, cómo a la luz de los conocimientos actuales y por trabajos diversos,



autores (Williamson, Iber y Chipman y Brazeau, Wallace y Owen) quedaba plenamente demostrado que el mecanismo de la excreción renal del pigmento biliar se hacía fundamentalmente por filtración glomerular y no por secreción tubular, ya que toda causa que alterase aquélla ("renal stop flow"), disminuía intensamente la bilirrubina, mientras que los factores que modificaban la secreción tubular, disminuyéndola (probenecid), no alteraban la excreción urinaria de bilirrubina.

Sin embargo en nuestra opinión, el problema no es tan simple. Como a otros autores, nos llamaba la atención algunos hechos. Que la bilirrubina se filtraba por el glomérulo era un hecho plenamente demostrado. Pero entonces, ¿porqué los aclaramientos de bilirrubina son tan exigüos, como podemos comprobar en la tabla XXXVI, frente a los de creatinina, siendo así que las cantidades de bilirrubina plasmática, al menos en las ictericias, son mucho más elevadas que las de creatinina? En la mencionada tabla podemos observar cómo el aclaramiento máximo de bilirrubina diglucuronizada (y elegimos esta forma del pigmento por ser la de mayor eliminación renal), en las ictericias fué de 4,727 c.c./mi., mientras que el aclaramiento mínimo de creatinina, en el grupo con peor función renal, fué de 36,19, muy superior al de aquélla.

Por otro lado, en la tabla XXXVII y en las figuras 55 y 56, podemos apreciar la falta absoluta de correlación entre los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina y el aclaramiento de creatinina. Si en la eliminación renal del pigmento hubiésemos de contar solo con un factor de filtración glomerular, debería existir un cierto paralelismo entre ambos tipos de aclaramiento en todos los grupos, disminuyendo los de bilirrubina al hacerlo el de creatinina y viceversa.

Para explicarnos esta disociación, partiendo de un mismo mecanismo de eliminación (filtración glomerular), hemos de admitir una de estas dos posibilidades: a) O presumir una mayor habilidad, de naturaleza desconocida, del glomérulo para filtrar la creatinina. b) O esta otra posibilidad: una posterior reabsorción tubular de la bilirrubina filtrada. Sobre esta segunda hipótesis, sospechada ya por Wallace y Owen, no se han publicado trabajos experimentales que los confirmen, que nosotros sepamos, y puede ser un nuevo motivo de trabajo de futuras investigaciones, modificando los factores que regulan la reabsorción tubular.

Esta segunda posibilidad de la posterior reabsorción tubular de la bilirru-

bina filtrada por el glomérulo nos parece muy sugestiva y nos basamos en algunos razonamientos: Aparte de que explicaría el menor grado del aclaramiento de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina frente al de la creatinina, como ya se ha dicho, justificaría la caída manifiesta de aquéllos aclaramientos en las disminuciones globales de la función renal (glomerular y tubular). Observamos que, dentro de las malas correlaciones de ambos tipos de aclaramiento, fué mejor en el grupo de las hepatopatías tumorales ( $r=0,463$ , para la diglucuronizada), donde la función renal estuvo globalmente más perjudicada. Tal vez se explique así la disminución del aclaramiento de bilirrubina encontrada por Fulop y col. (57) en casos de insuficiencia renal, y la ausencia de diferencia de aclaramientos del pigmento, tanto si el aclaramiento de creatinina estaba normal como si estaba bajo, hallada por Wallace y Owen (121): en el primer caso, pensamos, estaría perjudicada tanto la función glomerular como la tubular, mientras que en el segundo solo se contaba con el factor de la filtración glomerular, medida por el aclaramiento de creatinina.

Por otro lado, es posible que encuentre justificación en esta hipótesis, el hecho antiguo encontrado en autopsias de cadáveres, de una tinción amarillenta del epitelio tubular, con ausencia de la misma en el glomérulo, demostrada posteriormente, por técnicas histoquímicas, por Nizet y Barac (83), en enfermos fallecidos con ictericia. Este hallazgo, al principio, fué interpretado como demostrativo de una secreción tubular de la bilirrubina. Nosotros cambiamos el sentido de esta interpretación, asumiendo una reabsorción tubular: algo parecido a la patogenia que se postuló para explicar la albuminuria de las nefrosis, interpretada como debida a secreción tubular de las proteínas por haberse encontrado fenómeno de pinocitosis en las células de los túbulos; hoy está plenamente demostrado que las proteínas se pierden por el glomérulo y se reabsorben, en parte, en el túbulo, originando el mencionado fenómeno de la pinocitosis.

También comparamos los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina con otros parámetros de la función renal (vol/mi, pH y densidad de orina) y en general tampoco hallamos buenas correlaciones. Solamente hubo buena correlación del aclaramiento de la monoglucuronizada con el pH de la orina en el grupo de hepatopatías tumorales, siendo esta correlación de tipo directo (fig. 38). La relación del aclaramiento de la diconjugada con el pH de la orina fué moderada

( $r=0,778$ ) en el grupo de ictericias hemolíticas. Con el vol/mi de orina no hubo buena correlación en ningún grupo para ninguno de los dos tipos de aclaramiento, por lo que no pudimos confirmar los hallazgos de With (127), que encontró relación directa entre diuresis y bilirrubinuria, estando, en cambio, acordes nuestros resultados con los más antiguos de Haessles y col. (60). Finalmente, el aclaramiento de la monoglucuronizada estuvo aceptablemente correlacionado con la densidad de la orina en el grupo de ictericias hemolíticas y en el de hepatopatías tumorales ( $r=0,801$  y  $0,845$ , respectivamente), y el de la diglucuronizada lo estuvo, moderadamente, en el grupo de ictericias hemolíticas, también con la densidad de la orina ( $r=0,775$ ).

Podemos, por tanto, concluir que en nuestra opinión, la eliminación renal de bilirrubina depende de dos factores fundamentalmente, en lo que al riñón se refiere: filtración glomerular y posterior reabsorción tubular. Esta reabsorción, además de su menor filtración, es mayor para la bilirrubina monoglucuronizada por cuanto el aclaramiento de ésta siempre fué menor que el de la diglucuronizada. No existe correlación buena de los aclaramientos de bilirrubina con los de creatinina, pero parece existir mayor dependencia con el estado de la función renal global, estando muy disminuidos dichos aclaramientos cuando aquella está muy perjudicada, como aconteció en nuestro grupo de hepatopatías tumorales. La secreción tubular no parece ejercer una influencia decisiva en la eliminación del pigmento, ya que sabemos que factores que modifican la secreción tubular, disminuyéndola (probenacíd), no modifica la eliminación urinaria de bilirrubina.

#### 6) Influencias del pH sanguíneo y urinario en la eliminación renal de la bilirrubina.

Como ya comentamos en este apartado de la revisión bibliográfica, algunos autores (Ali Mam, Billing) encontraron correlación de los cambios del pH de la sangre y de la orina con la eliminación renal de bilirrubina, más asiduamente con el pH plasmático que con el urinario, de tal forma que el aclaramiento de bilirrubina aumentaba con la alcalosis de la sangre y disminuía con la acidosis.

Dada la escas variabilidad habitual del pH de la sangre, sobre todo dentro de un mismo sujeto, y la gran variabilidad de la intensidad de la bilirrubina, aún en un mismo paciente, según el momento evolutivo de su ictericia, nos sorprendía

mucho que aquel pudiera ejercer una influencia decisiva sobre la eliminación renal del pigmento. Teóricamente, hubiese sido más verosímil esta hipótesis aplicada al pH urinario, dado el mayor margen de variación de este parámetro, incluso dentro de un mismo paciente y de un día a otro.

Quisimos, por éello, tener nuestra propia experiencia sobre la influencia que los cambios del pH de la sangre y de la orina pudieran ejercer en la eliminación renal de la bilirrubina, determinando dicho parámetro en orina en todos los casos estudiados y, en un alto porcentaje de los mismos, también en sangre.

De la observación de las tablas X, XV, XX, XXV, XXX, XXXV, XXXVI y XXXVII, así como de las figuras 14, 15, 18, 19, 32, 33, 38, 46, 47, 48, 49, 57 y 58, podemos obtener las siguientes conclusiones:

a) En el grupo de los normales no hubo ninguna correlación buena de la bilirrubina total, directa e indirecta de la orina ni con el pH de la sangre ni con el de la orina.

b) En el grupo de ictericias hemolíticas hubo aceptable correlación de la bilirrubina total directa e indirecta de la orina con el pH de la sangre (figs. 18 y 19), siendo esta relación de tipo directo (a mayor alcalinización de la sangre mayor tasa de bilirrubina en orina). En cambio, la correlación con el pH de la orina fué nula.

c) También hubo buena correlación, de tipo directo, del pH de la sangre con las tasas de bilirrubina total, directa e indirecta en orina, en el grupo de ictericias obstructivas (tabla XXXV); pero, igual que en el grupo anterior, la correlación fué nula con el pH de la orina.

d) En el grupo de hepatopatías difusas crónicas solo existió una correlación aceptable de las tasas de bilirrubina en orina con el pH de la sangre, pero ninguna con el de la orina.

e) En el grupo de hepatopatías tumorales no se pudo estudiar la correlación con el pH de la sangre, por no haberse determinado dicho parámetro en ninguno de los casos. Pero con el pH de la orina, las correlaciones fueron así mismo nulas.

f) En el grupo de hepatopatías difusas agudas la correlación del pH de la sangre con las tasas de bilirrubina en orina fué falsamente buena, por cuanto el referido parámetro solo se determinó dos veces en este grupo. Pero, como en los grupos anteriores, las correlaciones fueron nulas con el pH de la orina.

g) Los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina se correlacionaron mal, en general, tanto con el pH de la sangre como con el de la orina (figs 57 y 58). Dentro de esta mala correlación, fué mejor con el pH de la sangre que con el de la orina. Solo hubo buena correlación con el aclaramiento de la bilirrubina monoglucuronizada, con el pH de la orina, en el grupo de hepatopatías tumorales ( $r=0,957$ ), de tipo directo. El aclaramiento de la diconjugada se correlacionó moderadamente con el pH de la orina ( $r=0,778$ ) en el grupo de ictericias hemolíticas.

Podemos, por tanto, resumir que los cambios del pH constituyen un factor escasamente modificador de la eliminación renal de la bilirrubina y que es el pH de la sangre el que mayor y más constante influencia ejerce sobre aquéllas, frente al pH de la orina que no ejerció influencia alguna en ninguno de nuestros grupos, si exceptuamos la correlación buena que hubo con el aclaramiento de la monconjugada en las hepatopatías tumorales.

Sabemos que la bilirrubina es tanto más soluble en un medio cuanto más alcalino es éste. Por otro lado, la bilirrubina solo se disocia de la albúmina a pH inferior a 5. Por estos dos hechos, creemos que si alguna influencia puede ejercer el pH sobre la eliminación renal de la bilirrubina, debe ser a través de un aumento de la solubilidad de la misma al hacerse más alcalino el plasma (cosa que, según acabamos de exponer, sucedió en nuestros pacientes) y no a través de una menor unión a la albúmina, ya que esto precisa cambios más intensos y, por supuesto en sentido de acidosis, lo contrario de lo que hemos observado en nuestros pacientes (referido por diversos autores también).

Otra hipótesis, como apuntara Billing, es la de que la influencia del pH se realice, no a través de un aumento de la filtración glomerular (al hacerse la bilirrubina más soluble en medio más alcalino) sino a través de una disminución de la reabsorción tubular, la cual tiene lugar al aumentar el pH de la sangre.

Serán precisas investigaciones ulteriores para dilucidar este interesante aspecto de la eliminación renal de la bilirrubina.

De todo lo reseñado en este capítulo de discusión de los resultados, podemos extraer una conclusión general:

La eliminación renal de la bilirrubina no está determinada por un solo factor, sino que múltiples factores, en mayor o menor grado, variable de unos

grupos de enfermos a otros y de uno a otro momento de su evolución clínica, se conjuntan de forma diversa en su actuación, resultando en una mayor o menor excreción urinaria del pigmento. Por esa multiplicidad y concomitancia de actuación de los mencionados factores, resulta difícil, si no imposible, determinar cuál o cuales de ellos son los más decisivos en el mecanismo de eliminación renal de la bilirrubina.

Tabla XXXVI

PARAMETROS EN LOS DIVERSOS GRUPOS						
PROMEDIO DE LOS MISMOS						
	N	A	"a"	"b"	"c"	C
B.T. en sangre	0,95	16,52	12,20	11,15	27,31	13,70
B.T. en orina	0,46	10,15	2,94	2,72	5,03	8,30
B.D. en sangre	0,27	10,68	8,31	7,68	18,50	10,34
B.D. en orina	0,28	8,72	2,41	2,21	3,38	7,13
B.I. en sangre	0,68	6,00	3,89	3,40	8,31	3,41
B.I. en orina	0,17	1,42	0,52	0,51	1,64	1,17
Mono en sangre	91,50	83,66	86,44	79,40	58,75	76,55
Mono en orina	37,28	29,66	21,33	41,31	51,25	45,15
Di en sangre	8,50	16,33	13,55	19,37	41,25	23,45
Di en orina	62,71	70,33	78,66	58,68	48,75	54,85
Aclar. Mono	0,131	0,222	0,126	0,174	0,206	0,205
Aclar. Di	9,559	4,727	3,563	3,272	0,582	3,504
Aclar. Creat.	87,81	77,06	121,40	122,77	36,19	82,18
pH sangre	7,35	7,45	7,47	7,45	X	7,44
pH orina	6,49	6,10	6,23	6,36	5,85	6,09
Vol/mi orina	0,97	0,792	1,141	1,317	1,215	0,74
Dens. orina	1018	1022	1019	1017	1007	1018
Albu. orina	0	0	0,137	0	0	C
Albu. sangre	X	3,51	3,39	3,03	2,78	3,25
Protrombina	X	88,80	90,44	62,87	54,75	78,56
Bromo	X	4,50	7,87	32,15	X	14,30
G.O.T.	X	301	968	554	166	198
F. Alcalina	X	8,56	6,64	7,46	16,46	13,11
L.A.P.	X	12,52	31,84	29,16	25,30	37,73

RELACION ENTRE PARAMETROS						
COEFICIENTES DE CORRELACION						
	N	A	"a"	"b"	"c"	C
B.T. Sangre-B.T. orina	0,489	0,952	0,393	0,881	0,477	0,957
B.D. Sangre-B.D. orina	0,028	0,953	0,423	0,874	0,726	0,923
B.I. Sangre-B.I. orina	0,443	0,940	0,176	0,603	0,105	0,733
Mono Sangre-Mono orina	0,218	0,351	0,322	0,128	0,976	0,199
Di Sangre-Di orina	0,218	0,351	0,322	0,128	0,976	0,199
Aclar Mono-Aclar creat.	0,092	0,508	0,513	0,116	0,516	0,071
Aclar-Di-Aclar creat.	0,190	0,429	0,300	0,005	0,463	0,043
Aclar Mono-pH sangre	0,331	0,633	1?	0,466	X	0,650
Aclar Di-pH sangre	0,655	0,358	1?	0,569	X	0,300
Aclar Mono-pH orina	0,297	0,107	0,058	0,039	0,957	0,182
Aclar Di-pH orina	0,655	0,778	0,596	0,211	0,264	0,271
Aclar Mono-Vol/mi orina	0,490	0,213	0,196	0,373	0,308	0,058
Aclar Di-Vol/mi orina	0,256	0,535	0,018	0,204	0,599	0,025
Aclar Mono-Dens. orina	0,179	0,801	0,047	0,331	0,845	0,015
Aclar Di-Dens. orina	0,362	0,755	0,265	0,177	0,470	0,201
Aclar Mono-Alb. orina	0	0	0,711	0	0	0
Aclar Di-Alb. orina	0	0	0,551	0	0	0
Aclar Mono-Alb. sangre	X	0,404	0,450	0,440	0,617	0,366
Aclar Di-Alb. sangre	X	0,950	0,141	0,269	0,414	0,160
Aclar Mono-Protrombina	X	0,410	0,414	0,379	0,966	0,109
Aclar Di-Protrombina	X	0,176	0,291	0,165	0,072	0,316
Aclar Mono-Bromo	X	1?	0,866	0,163	X	0,729
Aclar Di-Bromo	X	1?	0,911	0,298	X	0,579
Aclar Mono-Got	X	0,273	0,603	0,046	0,974	0,137
Aclar Di-GOT	X	0,426	0,152	0,335	0,105	0,110
Aclar Mono-F. Alcal.	X	0,049	0,056	0,087	0,792	0,151
Aclar Di-F. Alcal	X	0,050	0,055	0,299	0,324	0,263
Aclar Mono-L.A.P.	"	1?	0,420	0,073	1?	0,648
Aclar Di-L.A.P.	X	1?	0,635	0,266	1?	0,335



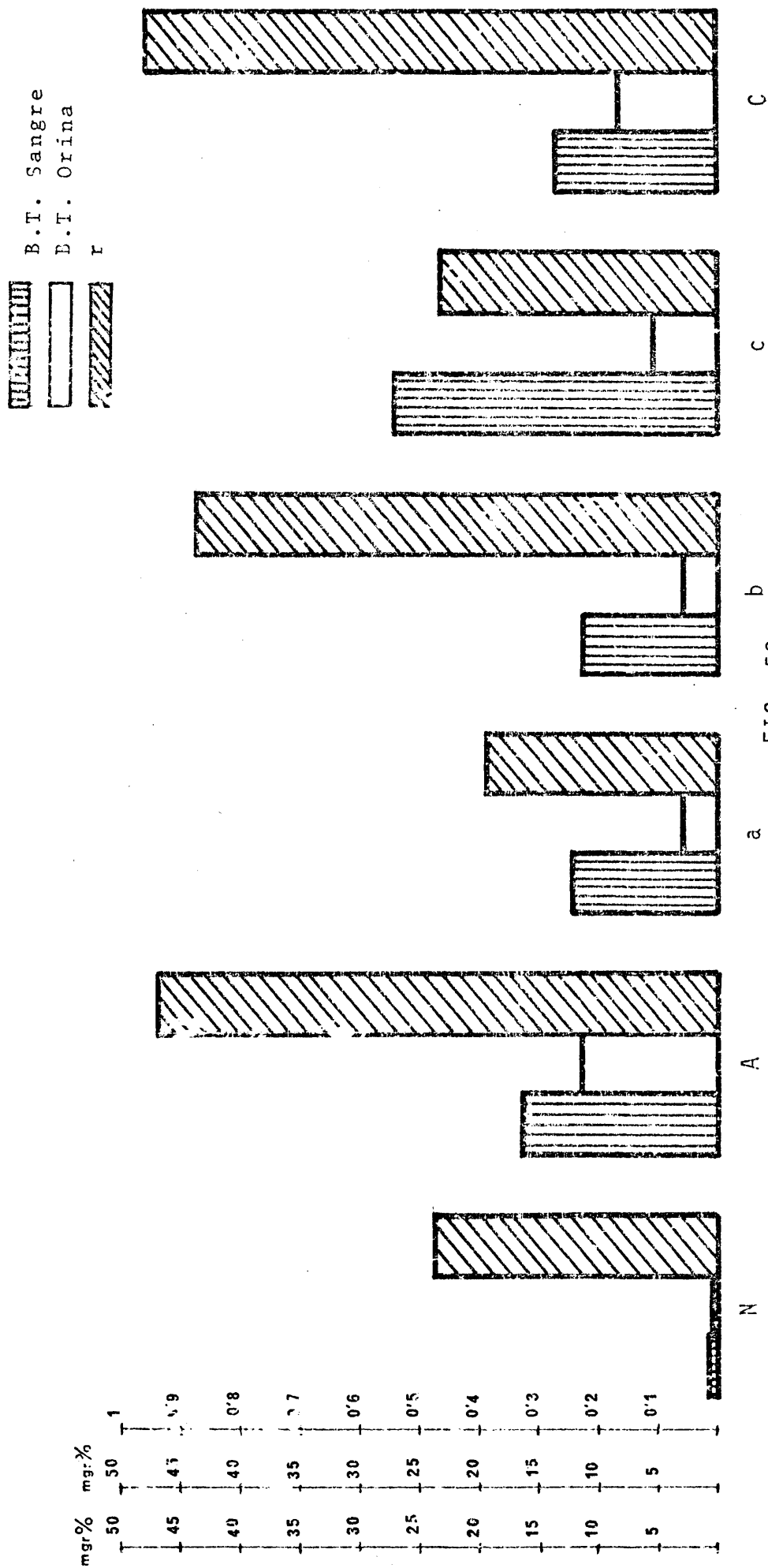
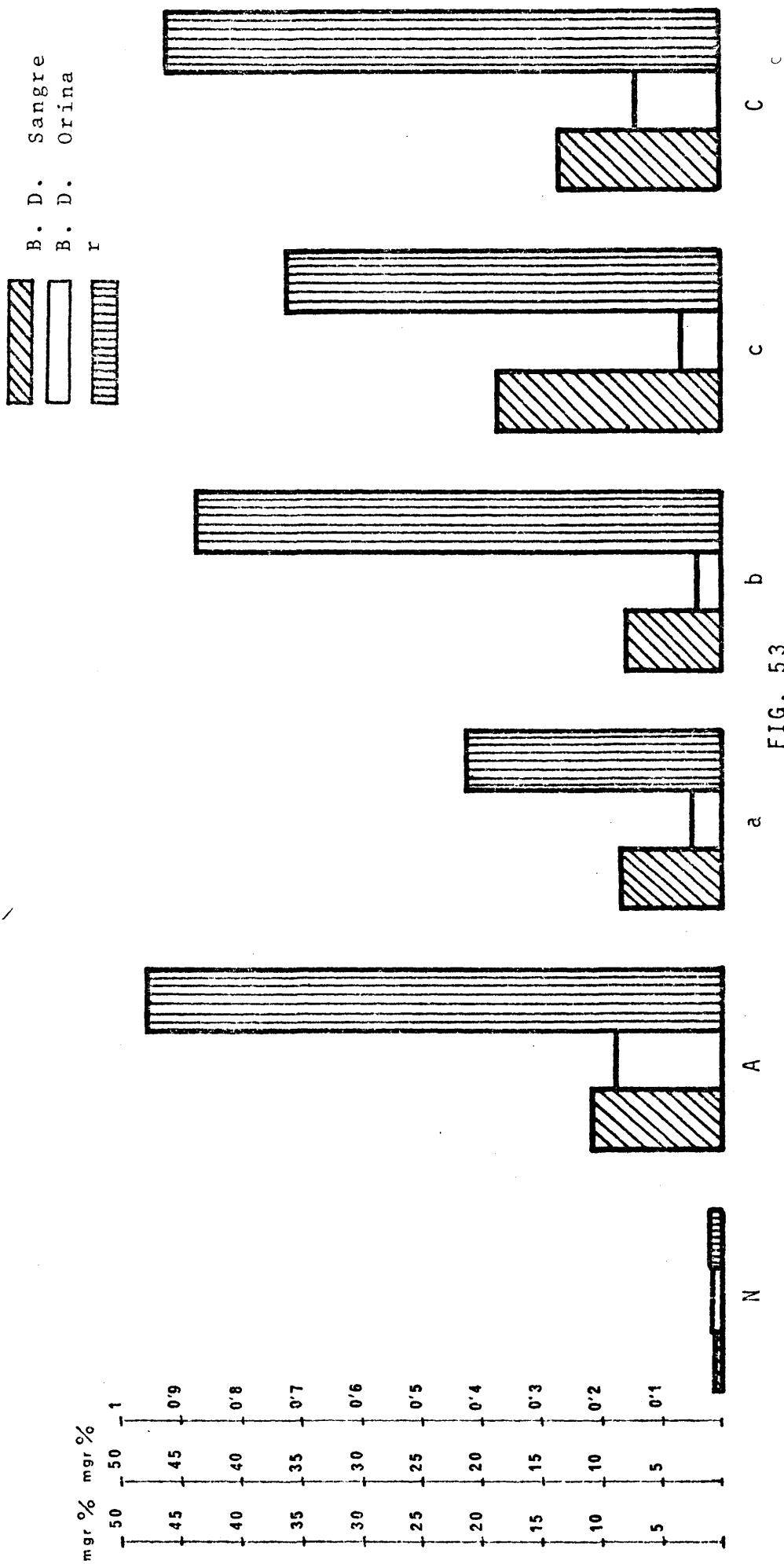


FIG. 52

CORRELACION (r) ENTRE BILIRRUBINA TOTAL (B.T.) EN SANGRE Y ORINA



CORRELACION (r) ENTRE BILIRRUBINA DIRECTA (B.D.) EN SANGRE Y ORINA

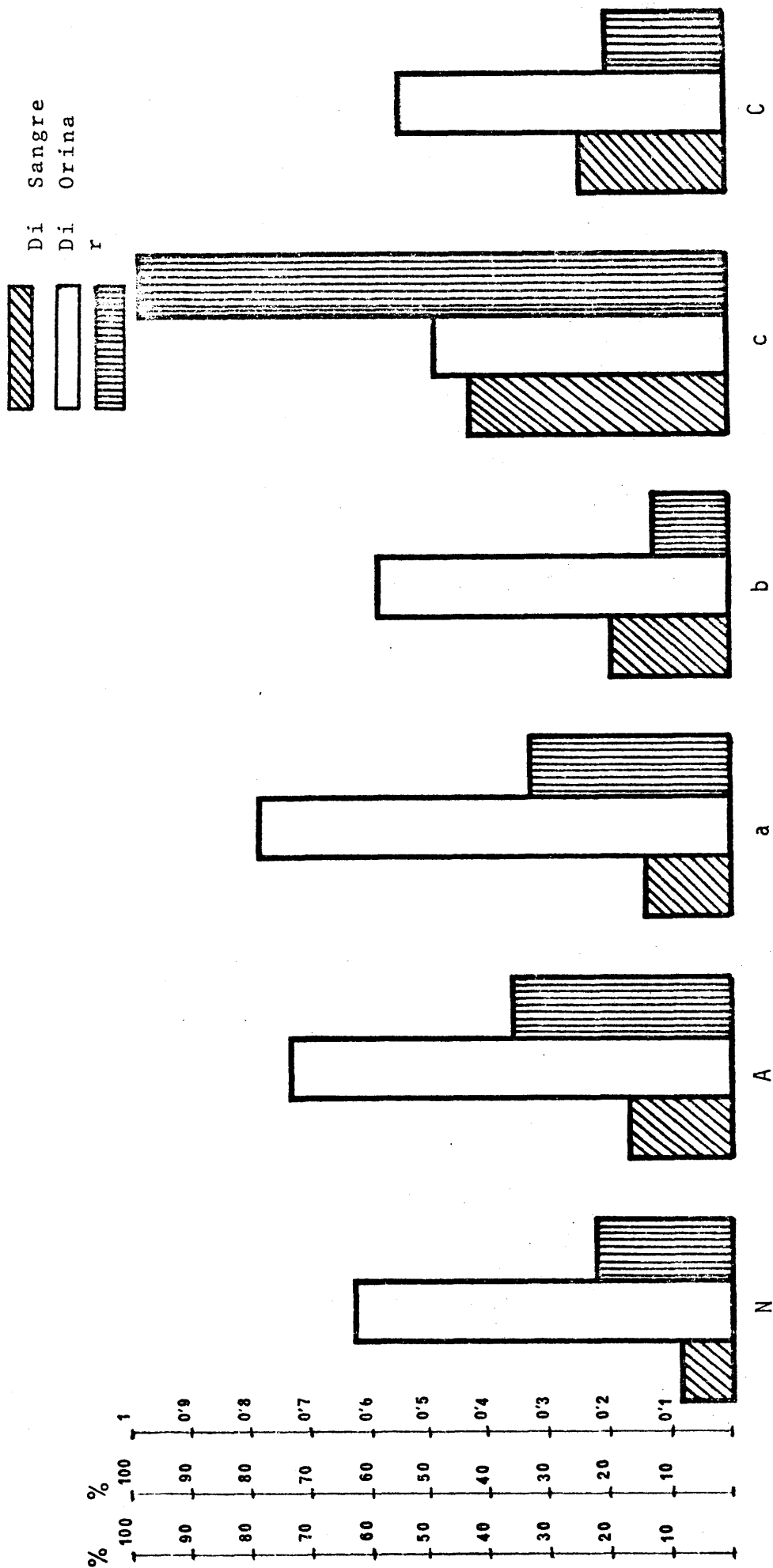


FIG. 54

CORRELACION (r) ENTRE BILIRRUBINA DIGLUCURONIZADA (Di) EN SANGRE Y ORINA

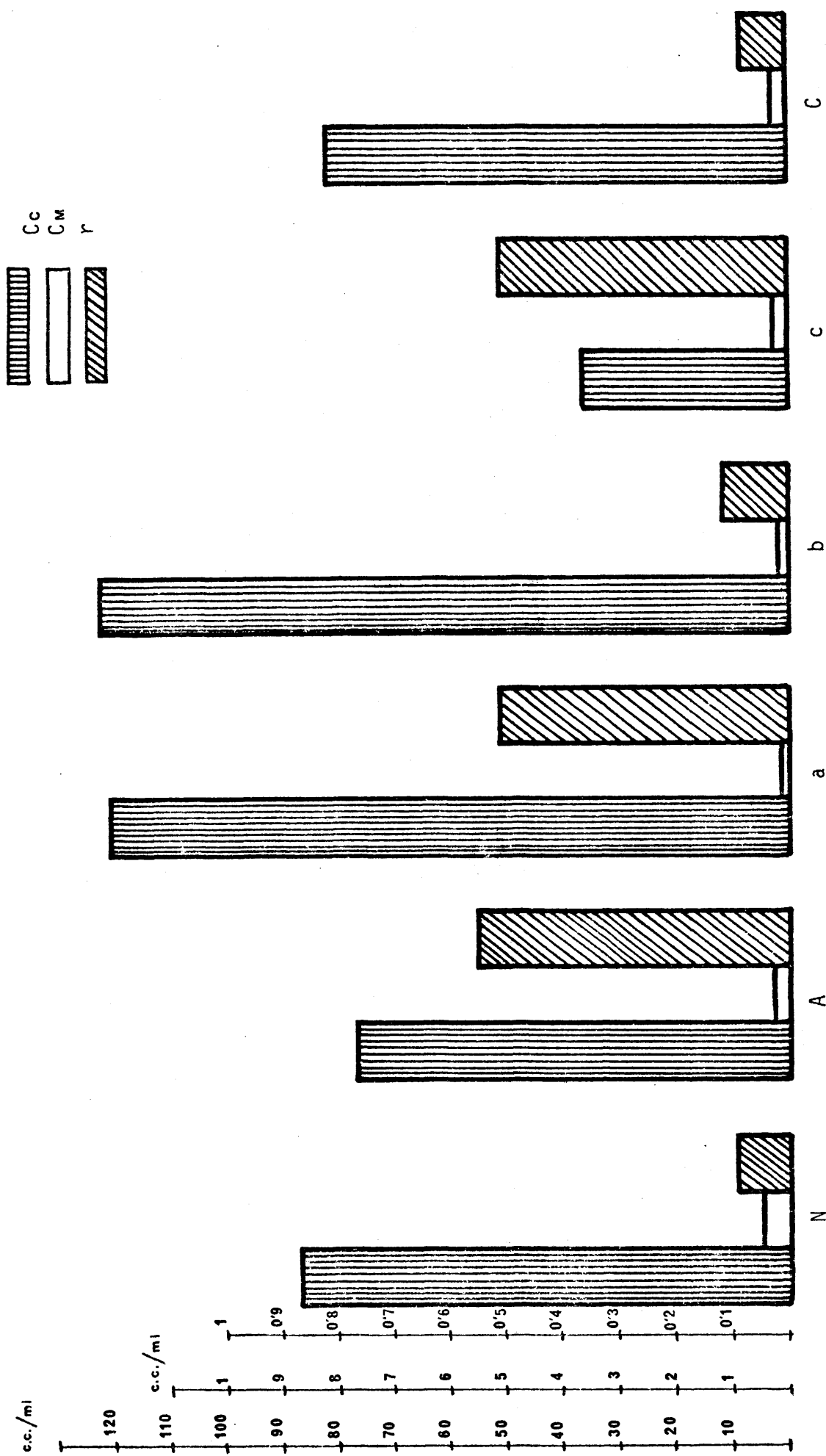


FIG. 55

CORRELACION ( $r$ ) ENTRE ACLARAMIENTO CREATININA ( $C_c$ ) Y ACLARAMIENTO DE BILIRRUBINA MONOGLUCURONIZADA ( $C_m$ )

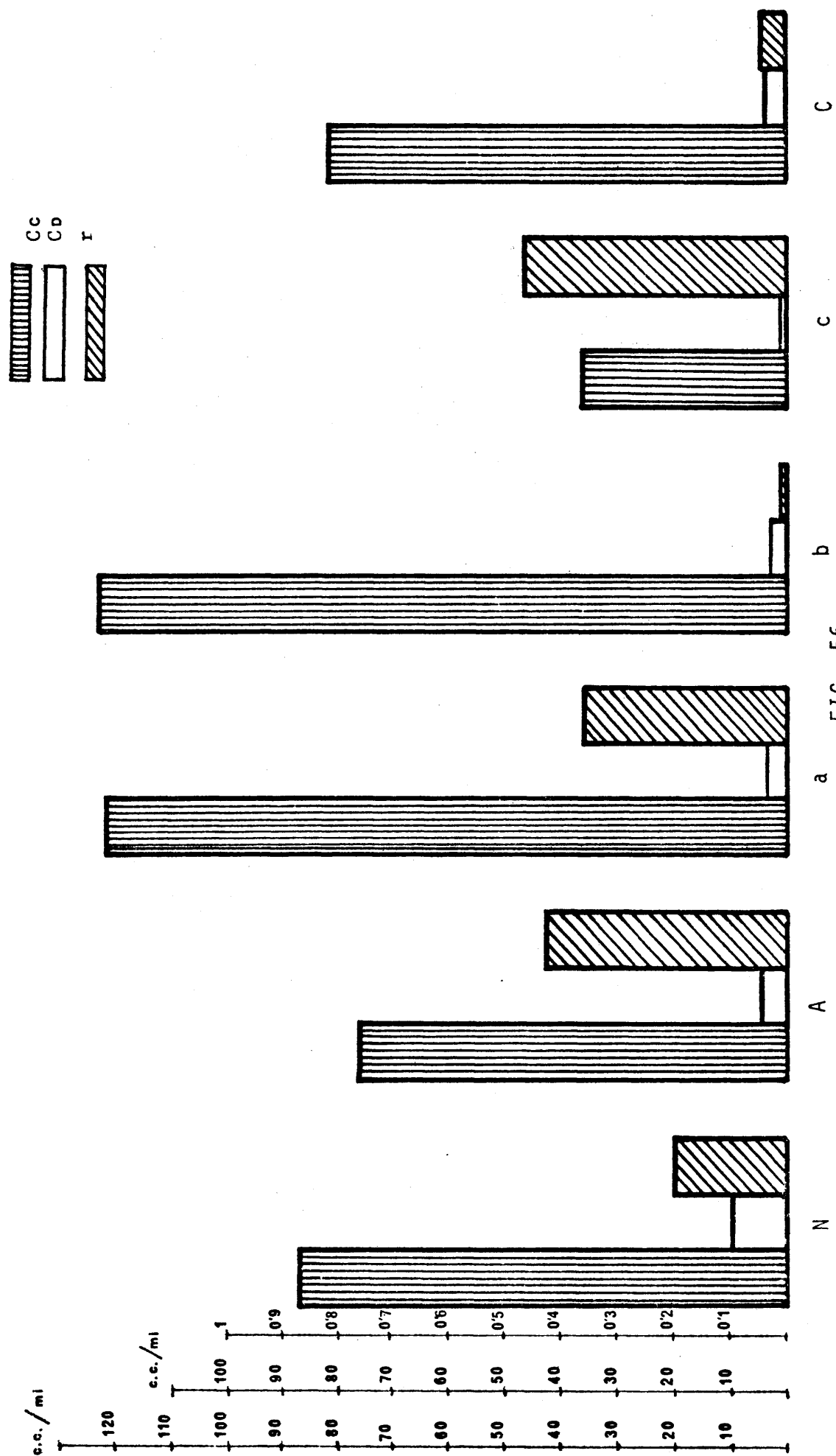


FIG. 56  
CORRELACION ( $r$ ) ENTRE ACLARAMIENTO DE CREATININA ( $C_c$ ) Y ACLARAMIENTO DE  $D_i$  ( $C_d$ )

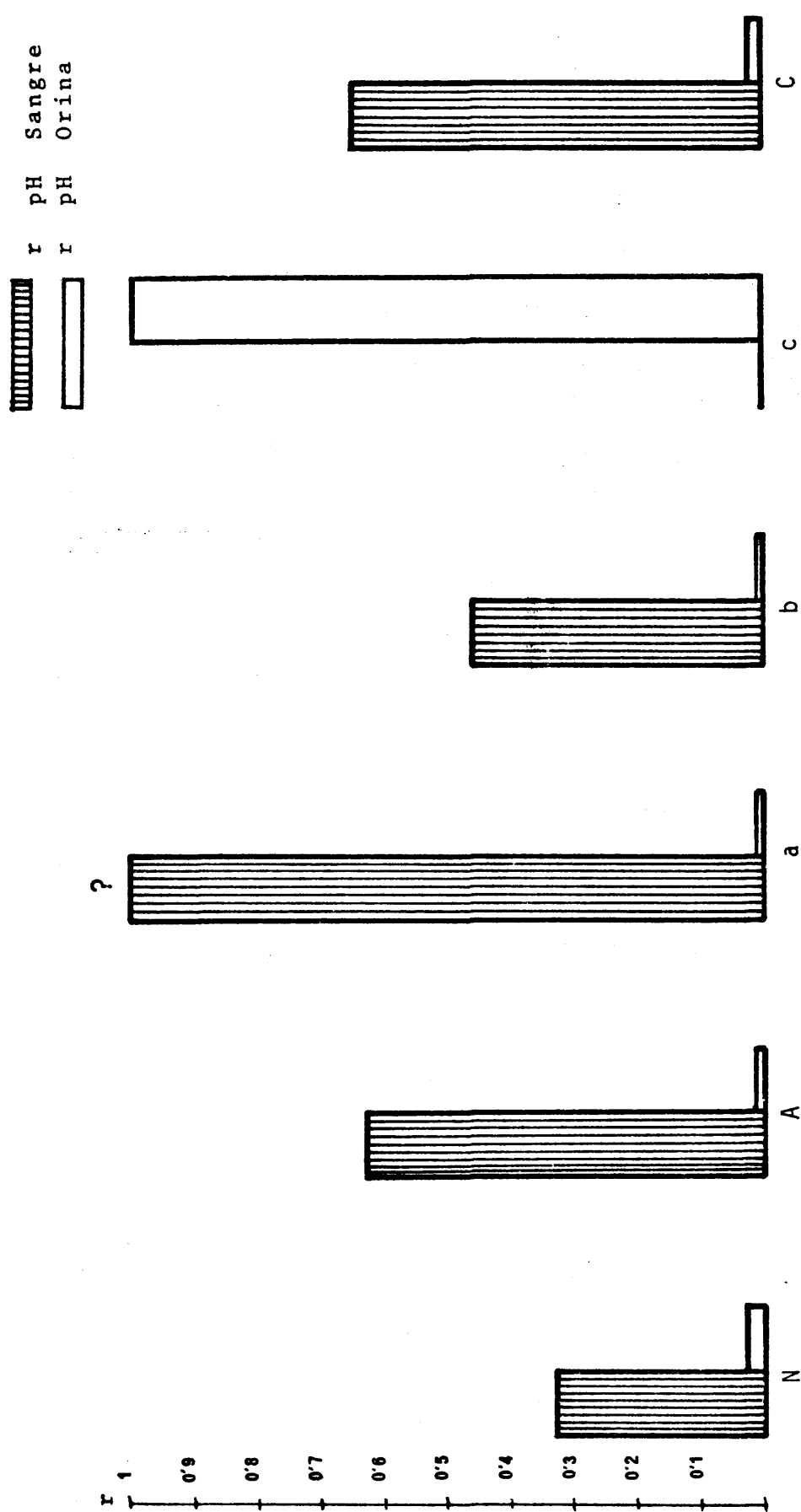


FIG. 57

CORRELACION ( $r$ ) DEL ACLARAMIENTO DE LA MONO CON EL PH DE LA SANGRE Y DE LA ORINA

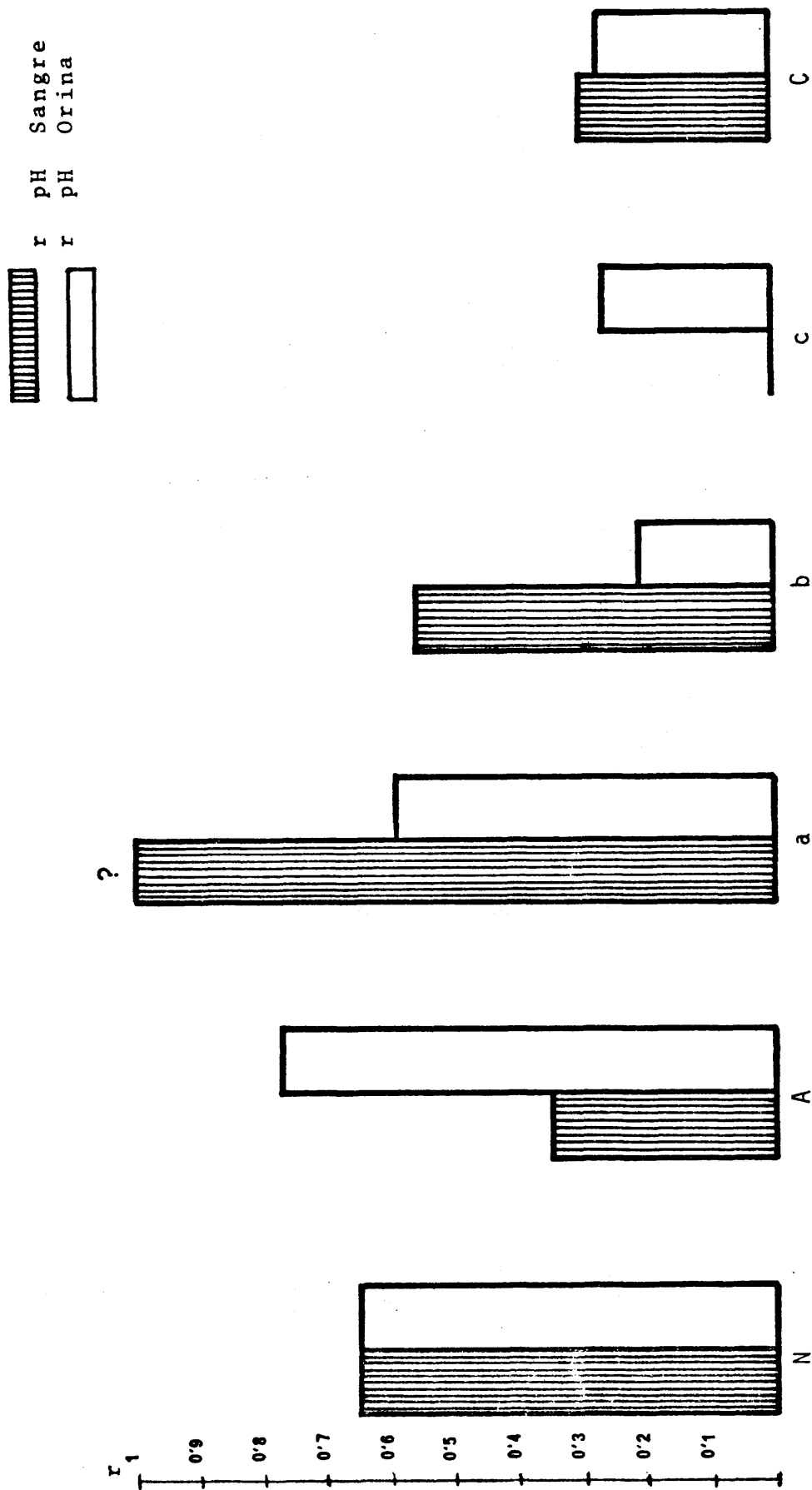


FIG. 58

CORRELACION ( $r$ ) ENTRE ACLARAMIENTO DE DI Y PH DE SANGRE Y ORINA

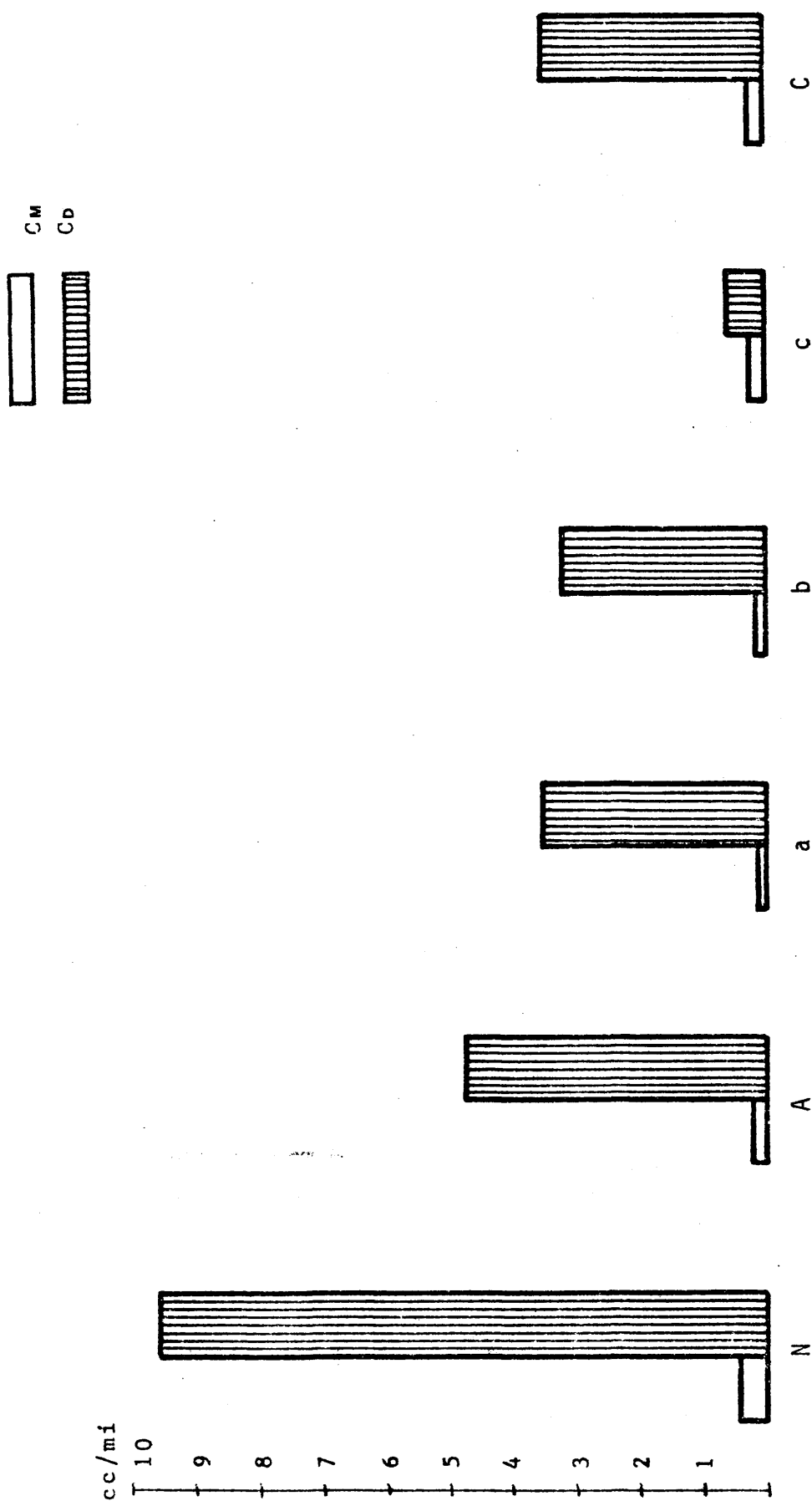


FIG. 59

ACLARAMIENTO DE MONO ( $C_M$ ) Y DE DI ( $C_D$ ) EN LOS DISTINTOS GRUPOS



## S I N T E S I S Y C O N C L U S I O N E S

---

### SINTESIS Y CONCLUSIONES.-

Hemos estudiado la conducta, en sangre y orina, de la bilirrubina total, indirecta y directa, así como de las fracciones glucuronizadas de ésta, en pacientes ictéricos, distribuidos, según la patogenia de la hiperbilirrubinemia, en tres grandes grupos: A) Ictericias por hemólisis. B) Ictericias por hepatopatías, subdivididas éstas en: a) hepatopatías difusas agudas. b) Hepatopatías difusas crónicas. c) Hepatopatías tumorales. C) Ictericias obstructivas. Así mismo, hemos realizado dichas determinaciones en un conjunto de sujetos normales, que nos sirvió de grupo control.

Paralelamente, para una mejor comprensión de la dinámica de los pigmentos biliares, en especial del aspecto que más nos interesaba, la excreción renal de los mismos, hemos determinado otra serie de parámetros en sangre y orina (pH en ambos medios; algunos tests convencionales del estado de función o lesión del hígado: albúmina sérica, gamma-globulina, protrombina, bromo, transaminasas, fosfatasas alcalinas, leucino-amino-peptidasa; tests de funcionalidad renal: densidad, albúmina y vol/ml de orina, aclaramiento de creatinina).

Hemos calculado, en todos los enfermos, los correspondientes aclaramientos renales de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, tanto de la forma monoconjugada como de la diconjugada.

Finalmente, en un intento de comprender el mecanismo de la eliminación renal de la bilirrubina, hemos establecido relación entre diversos parámetros con posible influencia sobre aquélla, calculando los correspondientes coeficientes de correlación en cada caso.

Todos los enfermos fueron diagnosticados por datos clínicos, analíticos, laparoscópicos, biopsicos o quirúrgicos.

Como síntesis de ello, llegamos a los siguientes resultados:

1) La fracción monoglucuronizada de la bilirrubina fué el pigmento conju-

gado dominante en sangre en todos los casos estudiados.

En el grupo de los normales fué practicamente la única forma de bilirrubina conjugada existente en plasma, ya que la cantidad de diglucuronizada fué exigua.

La menor tasa de aquélla en sangre la registró el grupo de hepatopatías tumorales, seguido, en orden ascendente, por el de ictericias obstructivas, hepatopatías crónicas, ictericias hemolíticas y hepatopatías agudas. Todos ellos mostraron menor tasa de bilirrubina monoglucuronizada en sangre que los normales.

2) Esta disminución de la forma monoconjugada en sangre, en relación a los normales, fué estadísticamente significativa en las hepatopatías difusas crónicas ( $p < 0,02$ ) hepatopatías tumorales ( $p < 0,001$ ) e ictericias obstructivas ( $p < 0,01$ ), pero no lo fué en los restantes grupos.

3) Por el contrario, la bilirrubina diglucuronizada predominó en orina en todos los grupos, excepto en las hepatopatías tumorales, donde encontramos un ligero predominio de la monoglucuronizada.

Las hepatopatías difusas agudas arrojaron el más alto porcentaje de bilirrubina diglucuronizada en orina, seguido por las ictericias hemolíticas, los normales, hepatopatías difusas crónicas, ictericias obstructivas y hepatopatías tumorales.

4) Hubo una disminución, estadísticamente significativa, de la bilirrubina diglucuronizada en orina, en las hepatopatías difusas crónicas ( $p < 0,05$ ), hepatopatías tumorales ( $p < 0,05$ ) e ictericias obstructivas ( $p < 0,05$ ) respecto a las hepatopatías difusas agudas, pero con los restantes grupos.

5) El aclaramiento de la bilirrubina diglucuronizada fué muy superior al de la monoglucuronizada en todos los grupos.

El valor, más alto de la diglucuronizada lo registraron los normales y el más bajo el grupo de hepatopatías tumorales.

6) Los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina, de unos grupos a otros, se comportaron de la siguientes manera (fig. 59).

a) Ictericias hemolíticas: Hubo una disminución del aclaramiento de la monoglucuronizada, respecto a los normales, estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ )

pero no la hubo para la diglucuronizada.

b) Hepatopatías difusas agudas: También hubo una disminución estadísticamente significativa del aclaramiento de la monoglucuronizada en relación a los normales ( $p < 0,01$ ), pero no hubo diferencias significativas con los restantes grupos.

Para el aclaramiento de la diconjugada, no hubo diferencias estadísticamente significativas, ni con el grupo de los normales ( $p > 0,05$ ) ni con los restantes.

c) Hepatopatías difusas crónicas: Ambos aclaramientos estuvieron significativamente disminuidos respecto a los normales ( $p < 0,001$  para la monoglucuronizada, y  $p < 0,05$  para la diglucuronizada), pero no hubo diferencia estadísticamente significativa con los demás grupos.

d) Hepatopatías tumorales: Los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina estuvieron muy disminuidos en estos enfermos, pero sin significación estadística para ningún grupo.

e) Ictericias obstructivas: Hubo una disminución significativa de los aclaramientos en relación a los normales ( $p < 0,01$  para la monoconjugada, y  $p < 0,05$  para la diconjugada) pero no respecto a los otros grupos.

7) La relación de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina con los cambios del pH, en los distintos grupos, fué la siguiente:

a) Aclaramiento de la monoglucuronizada: Registró escasa correlación con el pH de la sangre, de tipo directo, en las ictericias hemolíticas y en las obstructivas, y nada en los restantes grupos (fig. 57).

Con el pH de la orina, las correlaciones fueron nulas en los distintos grupos, excepto en el de las hepatopatías tumorales, donde hubo una excelente correlación ( $r=0,957$ ) de tipo directo (fig. 38): a mayor alcalinización de la orina, mayor aclaramiento de pigmento monoconjugado (fig. 57).

b) Aclaramiento de la diglucuronizada: la relación con el pH de la sangre fué escasa y de tipo directo en el grupo de los normales, y nula en los restantes grupos (fig. 58).

Con el pH de la orina, la correlación fué escasa y directa en los normales e ictericias hemolíticas, y nula en los otros grupos (fig. 58).

8) Las correlaciones de los aclaramientos con el vol/mi de orina, fueron

todas malas en los distintos grupos, tanto para la mono como para la diglucuronizada.

9) Con la densidad y la albúmina de la orina, las correlaciones fueron escasas en unos grupos (ictericias hemolíticas y hepatopatías tumorales) y nulas en los restantes grupos.

10) Con el aclaramiento de creatinina se correlacionaron mal los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina en todos los grupos (figs. 55 y 56).

Ya intentamos, en la discusión de los resultados, justificar esta disociación, admitiendo, además de una filtración glomerular del pigmento, una posterior reabsorción tubular del mismo, consecuencia de lo cual los aclaramientos de bilirrubina son mucho más bajos que los de creatinina, no existiendo dependencia de aquéllos con éstos.

11) Respecto a la albúmina plasmática, solo hubo buena correlación con el aclaramiento de la diglucuronizada en el grupo de ictericias hemolíticas ( $r=0,950$ ), siendo esta dependencia de tipo inverso: a mayor tasa de albúmina en sangre, menor aclaramiento de bilirrubina diglucuronizada (fig. 21).

12) Para la protrombina, solo hubo buena correlación ( $r=0,966$ ), de tipo directo (fig. 41) con el aclaramiento de la monoglucuronizada en el grupo de hepatopatías tumorales, siendo nula para ambos aclaramientos en los restantes grupos.

13) El aclaramiento de la monoglucuronizada se relacionó aceptablemente ( $r=0,866$ ) con la bromo, en el grupo de hepatopatías difusas agudas, y escasamente ( $r=0,729$ ) en las ictericias obstructivas.

El aclaramiento de la diglucuronizada se correlacionó excelentemente ( $r=0,91$ ) de forma directa (fig. 26) con el grado de retención de la bromo, en el grupo de hepatopatías agudas.

14) Ambos aclaramientos se correlacionaron mal con el grado de necrosis hepática (medido por las transaminasas).

Solo hubo excelente correlación de aquéllos con el aclaramiento de la monogluconjugada ( $r=0,974$ ), en el grupo hepatopatías tumorales. Siendo esta correlación de tipo inverso (fig. 42): a mayor grado de necrosis hepática, menor aclaramiento de bilirrubina monoglucuronizada.

15) No encontramos buena relación entre el grado de colestasis (medido por las fosfatasa alcalinas y leucino-amino-peptidasa) con los aclaramientos de las

fracciones de la bilirrubina.

Solamente el aclaramiento de la monoconjugada se correlacionó aceptablemente ( $r=0,792$ ) con las fofatasas alcalinas en el grupo de hepatopatías tumorales, siendo esta correlación de tipo directo: a mayor grado de colestasis, mayor aclaramiento de bilirrubina monoglucuronizada.

La correlación fué escasa ( $r=0,648$ ) con la L.A.P., en el grupo de ictericias obstructivas, para el aclaramiento de la monoconjugada; y en el mismo grado ( $r=0,635$ ), en el grupo de hepatopatías agudas, para el de la diconjugada.

Como consecuencia de todo lo expuesto hasta aquí, deducimos estas conclusiones finales:

16) Aún cuando existe una cierta relación entre la intensidad de la bilirrubinuria y de la bilirrubinemia, en modo alguno esta correlación es lineal ni constante, por lo que la eliminación renal del pigmento depende de algunos otros factores además del grado de la colemia (fig. 52).

El umbral renal de bilirrubina es muy bajo, ya que encontramos aquélla en orina aún en presencia de tasas normales en sangre.

17) Si bien la conjugación de la bilirrubina es decisiva para su eliminación renal, por cuanto en dicho estado predominó en orina en todos los grupos, no hay estrecho paralelismo entre las tasas de aquélla en sangre y las correspondientes en orina, por lo que el grado de solubilidad del pigmento no es tampoco el único que decide su eliminación por el riñón.

18) El estado de la función hepática no parece ejercer influencia alguna en la eliminación renal de bilirrubina monoglucuronizada. Respecto a la eliminación de bilirrubina diglucuronizada, solo ejerce alguna influencia cuando la función de aquél órgano está muy deteriorada, en donde se produce una manifiesta caída de dicho aclaramiento, como sucedió en nuestro grupo de hepatopatías tumorales.

19) Puesto que la bilirrubina, directa e indirecta, esta unida a la albúmina plasmática, y que la bilirrubinuria no se acompaña de albuminuria, hemos de concluir en que tiene lugar una disociación del pigmento de la proteína sérica transportadora, previamente a su eliminación renal. Como dicha unión es más fuerte para la bilirrubina no conjugada, tal vez éllo contribuya a la menor presencia en orina de esta forma de bilirrubina.

20) En relación al mecanismo de la eliminación renal de bilirrubina, nosotros opinamos que dos factores primordiales intervienen: a) Filtración glomerular del pigmento. b) Posteriormente reabsorción tubular del mismo. Esta reabsorción es mayor para la bilirrubina monoglucuronizada, por cuanto el aclaramiento de ésta siempre fué menor que el de la diglucuronizada.

Este doble mecanismo justificaria la ausencia de correlación de aquéllos aclaramientos con la afectación parcial (glomerular o tubular) de la función renal (como sucede cuando intentamos correlacionarlos con el aclaramiento de creatinina, por ejemplo) y la mejor dependencia de la afectación global del órgano (como ocurrió en los enfermos con insuficiencia renal, de Fulop y col., y en nuestro propio grupo de hepatopatías tumorales con manifiesta afectación renal global).

Esta mayor capacidad de reabsorción tubular para la bilirrubina monoglucuronizada cobra mayor interés desde los trabajos de Léster y Schmid (75) que observaron una mayor reabsorción intestinal de bilirrubina no conjugada o monoconjugada, frente a la diconjugada, cuya reabsorción fué prácticamente nula. A nivel renal podría tener lugar un mecanismo similar.

La secreción tubular no parecer ejercer acción alguna, por cuanto los factores que la modifican (como el Probenecid, disminuyendola) no alteran la eliminación renal del pigmento (Fulop y Brazeau).

21) Los cambios del pH constituyen un factor escasamente modificador de la eliminación renal de bilirrubina, aumentandola, en general, cuando aquél tiende hacia la alcalinidad.

Nosotros opinamos que esta escasa acción del pH se realiza a través de un aumento de la solubilidad de la bilirrubina al aumentar la alcalinidad del medio, ya que a pH fisiológico (tanto en sangre como en orina) éste no interviene en la disociación de la bilirrubina, la cual solo tiene lugar a pH inferior a 5.

Por tanto, llegamos a estas últimas conclusiones generales:

22) La eliminación renal de la bilirrubina, en particular de las fracciones glucuronizadas de la misma, no está determinada por un solo factor, sino que múltiples de ellos, en mayor o menor grado, variable de uno a otro grupo de enfermos y del momento de su evolución clínica, se conjuntan en su actuación de forma diversa, resultando en una mayor o menor excreción del pigmento. Por esa

multiplicidad y concomitancia de actuación de los mencionados factores, resulta difícil, si no imposible, determinar cuál de ellos es el más decisivo en el mecanismo de la eliminación renal de la bilirrubina.

23) De la síntesis de los resultados expuestos, debemos concluir que el estudio de los aclaramientos de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina no aporta, por sí solo, datos substanciales para la ayuda en el diagnóstico diferencial de las ictericias, debido a la diversidad de factores (plasmáticos, hepáticos, renales) capaces de modificar el grado de eliminación renal de los pigmentos biliares, aunque en condiciones de filtración glomerular normal, la alteración del aclaramiento de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina puede indicar una disfunción enzimática tubular en conexión con el estado de la función hepática. Ello abre nuevas perspectivas para un futuro estudio sobre las condiciones de la reabsorción tubular de la bilirrubina.



## BIBLIOGRAFIA

---

B I B L I O G R A F I A

1.-ALI, M.A.M.

"Effect of acid-base changes on renal of bile pigments."  
Clin. Sci. 30:543. 1966

---

2.-ARIAS, I.M.

"Studies of chronic familial Non-Hemolytic Jaundice bilirubin  
int the serum With and Withont an unidentified pigment in the liver cell  
Ann. J. Med. 31:510. Oct. 1961

---

3.-ARIAS, I.M.; GARTNER, L.M.; COHEN, M.; ESSER, J.B.; LEVI, A.J.

"Chronic Non-Hemolytic unconjugated hiperbilirubinaemia With glucuronyl  
transferase deficiency"  
Amer. J. Med. 47:395. 1969

---

4.-ARIAS, I.M.

"Hepatic aspects of bilirubin metabolism"  
Ann. Rev. Med. 17:257. 1966

---

5.-ARIAS, I.M.

"Transfer of bilirubin from blood to bile"  
Seminars in hematology. 9:55. 1972

---

6.-BARBER-RILEY, G.; GOETZEE, A.E.; RICHARDS, T.G. and THOMSON, J.Y.

"The transfers of bromsulphhalein from the plasma to the bile in man"  
Clin, Sci. 20:149. 1961

---

7.-BARAC, G. et HEIRWEGH, K.

"Mecanisme de la bilirubinurie provoqué par la bilirubine non conju-  
guées (B.N.C.) exogène, chez le Chien.  
J. de Physiologie. Suplement 2 Tomo 62. 23-IX-70

---

8.-BARAC, G.

"Urinary and biliary elimination of bilirubin after intravenons inyec-  
tion of nonconjugated bilirubin (N.C.B.) in dogs"  
C.R. Soc. Biol (Paris) 164:916. 1970

---

- 9.-BARAC, G.  
"Cénapse albumino-bilirubinique et élimination rénale de la bili -  
rubine".  
Bull. Soc. Chim. Biol (Paris). 29:9. 1947
- 
- 10.-BARAC, G.  
"Bilirubinémie totale et élimination renale de la bilirrubine chez  
l'Homme normal et ictérique"  
C.R. Soc. Biol. 139:414. 1945
- 
- 11.-BARAC, G.  
"Nouvelles données sur la cénapse albumino-bilirubinique"  
Bull. Soc. Chim. Biol. 28:633. 1946
- 
- 12.-BARAC, G.  
"Dosage de la bilirubine dans l'urine par photométrie et para diaro-  
reaction"  
C.R. Soc. Biol. 139:412. 1945
- 
- 13.-BARAC, G  
"Elimination urinaire de la bilirubine non conjuguées chez le Chien"  
C.R. Soc. Biol 163:1971. Año 1969
- 
- 14.-BARAC, G  
"Interactions of bilirubin With plasma protins, and the estate of  
bilirubin in normal human plasma"  
Arch. Internat. Physiol. LXI:129. 1953
- 
- 15.-BARNIVILLE, H.T.F. Misk, R  
"Urinary glucuronic acid excretion in liver disease and the effect  
of a salicylamide load"  
Brit. Med. Jour. i, 337. 1959
- 
- 16.-BARRETT, P.V.D; BERK, P.D.; MENKEN, M.; BERLIN, N.I.  
"Bilirubin turnover studies in normal and pathologic states utilizing  
bilirubin C<sup>14</sup> "  
Ann. Int. Med. 68:355. 1968
-

- 17.-BERK, PAUL D.; BLOOMER, JOSEPH R.; HOWE, ROBERT B.; BERLIN, NATHANIEL I.  
"Constitutional hepatic dyfunction (Gilbert's syndrome)"  
Ann. J. Med. 49:296. Septbre 1970
- 
- 18.-BERNSTEIN, R.B.  
"Comparison of Serum clearance and urinary excretion of Mesobilirubinogeno-H<sup>3</sup> in control subjects and patients With liver disease"  
Gastroenterology. Vol. 61 n° 5 Pag. 733 Novbre 1971
- 
- 19.-BILLING, BARBARA; WILLIAMS, ROGER and RICHARDS, T.G.  
"Defects in hepatic transport of bilirubin in congenital hyperbilirubinemia: an analysis of plasma bilirubin disappearance curves"  
Clin. Sci. 27:245. 1964
- 
- 20.-BILLING, B.; LATHE, G.H.  
"Bilirubin metabolism in jaundice"  
Amer. J. Med. 24:111. 1958
- 
- 21.-BILLING, B.H.  
"The action of drugs on bilirubin metabolism in man"  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 179:403. 6-VII-71
- 
- 22.-BILLING, B.H.  
"Enigma of bilirubin conjugation"  
Gastroenterology. 61:258. Aug. 1971
- 
- 23.-BILLING, B.; GRAY, C.H. KULEZYCKA, A. ; MANFIELD, P. NICHOLSON, D.C.  
"The metabolism of <sup>14</sup>C-bilirubin in congenital monhaemolytic hyperbilirubinaemia"  
Clin. Sci. 27:163. 1964
- 
- 24.-BILLING, B.; MAGGIORE, Q.; CARTER, M.A.  
"Hepatic transport of bilirubin"  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 111:139. 1963
- 
- 25.-BLACK, M.; BILLING, B.  
"Hepatic bilirubin UDP-glucuronyl-transferase activity in liver disease and Gilbert's syndrome"  
New Eng. J. Med. 280:1266. 1969
-

26.-BLASCHKE, T.F.; BERK, PAUL D.

"Augmentation of bilirubin UDP-glucuronyl-transferase activity in rat liver homogenates by glutethimide (36665)"

P.S.E.B.M. 140:1315. 1972

---

27.-BOCKUS.

"Gastroenterologia" Tomo III

Edit. Salvat. Año 1968, Edición española.

---

28.-BOURKE, E.; MILNE, M.D.; STOKES, G.S.

"Mechanisms of renal excretion of urobilinogen"

Brit. Med. J. 2:1510. Dec. 1965

---

29.-BOURRILLON, R.

"Ysolement et propriétés du complexe bilirubine-serumalbumine du sérum"

Bull. Soc. Chim. Biol 39:385. 1957

---

30.-BROWN, W.R.; GRODSKY, G.M.; CARBONE, J.V.

"Intracellular distribution of triated bilirubin during hepatic uptake and excretion.

Amer. J. Physiol 207:1237. 1964

---

31.-BROCKNER, J.

"A study on the estimation of low concentrations of serum bilirubin"

Amer. J. Clin. Path. 32:513. 1959

---

32.-BRUGUERA, M.; ESQUERDA, J.E.; RODES, J.

"Consideraciones a-cerca de la naturaleza del pigmento de la enf. de Dubin-Johnson." A proposito de 4 observaciones"

Rev. Clin. Esp. 117:151. 30-IV-70

---

33.-BUNN, H. FRANKLIN.

"Erythrocyte destruction and Hemoglobin catabolism"

Seminars in Hematology 9:3. Jan. 1972

---

34.-BURUSTINE, RICHARD C.; SCHMID, RUDI.

"Solubility of bilirubin in aqueous solutions"

Proc. Soc. Exp. Biol. 109:356. 1962

- 35.-CALLAHAN, EDWARD W.JR.; THALE, MICHAEL M.; KARON, M.; BANER, K., and SCHMID  
"Phototherapy of severe unconjugated hyperbilirubinemia: formation and  
removal of labeled bilirubin derivatives".  
Pediatrics 46:841. Dec. 1970
- 
- 36.-CAMERON, J.L.; FILLER, R.M.; IBER, F.L. ABEL, T.; RANDOLPH, J.G.  
"Metabolism and excretion of <sup>14</sup>C-labeled bilirubin in children with  
biliary atresia"  
New Engl. J. Med. 274:231. 1966
- 
- 37.-CANTAROW, SCHEPARTZ  
"Bioquímica"  
Editorial Interoamericana, 3ª edición 1.964
- 
- 38.-CONGH, R.D.  
"Routine screening for urinary bilirubin in hospitalized patients"  
Amer. J. Clin. Path. 53:194. Feb. 70
- 
- 39.-GRIGLER, J.F. JR.; GOLD, N.I.  
"Effect of sodium phenobarbital on bilirubin metabolism in infant  
with congenital non hemolytic unconjugated hyperbilirubinemia, and  
Kernicterus."  
J. Clin. Invest. 48:42. 1969
- 
- 40.-DAVIES, D.S.; THORGEIRSSON, S.S.  
"Mechanism of hepatic drug oxidation and its relationship to individual  
difference in rates of oxidation in man."  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 179:411 6-VII-71
- 
- 41.-DIAZ RUBIO, M.; DIAZ RUBIO, M. (JR.) y MARTIN SANTOS, J.  
"Conducta de las fracciones glucuronizadas de la bilirrubina en ratas  
intoxicadas agudamente con EL<sub>4</sub>C, tras la sobrecarga con bilirrubina libre"  
Rev. Clin. Esp. 104:221. 15-II-67
- 
- 42.-DIAZ RUBIO, M.  
"Lecciones de Patología Médica. Digestivo"  
Edit. Marban Pags. 655-687. Año 1964
-

43.-DIAZ-RUBIO GARCIA, M.

"Estudio experimental y clínico del metabolismo de los pigmentos biliares  
Tesis Doctoral. Madrid. Abril de 1.967

---

44.-DIAZ-RUBIO,(JR.) RODRIGUEZ AGULLO, J.L.

"Aclaramiento renal fracciones glucuron bilirrubina"  
Rev. Esp. Enf. Ap. Dig. 10:1099, 1966.

---

45.-DOMMERQUES, J.P.

"Heptologie infantile. Metabolisme de la bilirubine, ictère néonatal"  
Press. Medicale. pag. 1151. 22 de Abril de 1972

---

46.-EDITORIALS

"Enterohepatic circulation"  
New Eng. J, Med. 284:48. Jan, 7-1971

---

47.-EDITORIALS

"Jaundice of the Newborn and phenobarbitone"  
The Lancet 16-Jan-1971

---

48.-ELDER, G.;GRAY, C.H.; Nicholson, D.C.

"Bile pigment fate in gastrointestinal tract"  
Seminars in Hematology 9:71. Jan 1972

---

49.-ERLINGER, S.

"The mechanisms of bile secretion"  
Rev. Int. Hepat. 18:1-39. 1968

---

50.-FEVERY, J.; HEIRWEGH, K.; DE GROOTE, J.

"Renal bilirubin clearance in liver patients"  
Clin. Chim. Acta. 17:63. 1967

---

51.-FEVERY, J.; van DAMME, B.; MICHIELS, R.; DE GROOTE, J. and HEIRWEGH, K.P.

"Bilirubin conjugates in bile of man and rat in the normal state and in  
liver disease.  
J. Clin. Invest. 51:2482. 1972

---

52.-FINDGENOVA, T.V.; GLAZUNOVA, L.M.

"Bile pigment biliverdin in the cells of microorganisms"

Revista rusa, con resumen en inglés Vol.XXXVIII, pag. 1017 año 1969

---

53.-FLEISCHNER, G.; ARIAS, M.I.

"Recent advances in bilirubin formation, transport, metabolism and excretion".

Amer. J. Med. 49:576. Nov. 1970

---

54.-FULOP, M.; SANDSON, I.; BRAZEAU, P.

"Dialyzability, protein binding, and renal excretion of plasma conjugated bilirubin"

J. Clin. Invest. 44:666. 1965

---

55.-FULOP, M.; BRAZEAU, P.

"The renal excretion of bilirubin in dogs With obstructive jaundice"

J. Clin. Invest. 43:1.192. 1964

---

56.-FULOP, M.; SANDSON, J. and BRAZEAU, P.

"Dialysability of conjugated bilirubin from plasma of jaundice dogs and patients (preliminary communication)".

Lancet. 1:1017. 1964

---

57.-FULOP, M. and BRAZEAU, P.

"Impaired renal function exaggerates hyperbilirubinemia in bile duct-ligated dogs"

Ann. J. Digest. Diseases. vol. 15 nº 12 pag. 1067. Decem. 1970

---

58.-GOTLIED, A.

"Urinary excretion of free and conjugated glucuronic acid in jaundice newborn"

Acta. Paediatrica. Scand. 60:437. Jul. 1971

---

59.-GRAY, C.H.; KEKWICK, R.A.

"Bilirubin-Serum Protein complexes and the van den Bergh reaction"

Nature 161:274. 1948

---



- 60.-HAESSLER, H.; ROUS, P.; BRONN, G.D.  
"The renal elimination of bilirubin"  
J. Exp. Med. 35:533. 1922
- 

- 61.-HALASZ, M.  
"Ueber die bilirubinausscheidung und glomerulus-filtration bis mechanischen und parenchymatosen ikterus"  
Schweiz. Med. Wchschr. 75:220. 1945
- 

- 62.-HECHT, I.  
"Bilirubin metabolism and its disorders"  
Rev. Med. Chim. Mal. Foie. 46:53. 1971
- 

- 63.-HOFFMAN, H.N.; WHITCOMB, F.F.; BUTT, H.R. and BOLLMAN, J.L.  
"Bile pigments of jaundice"  
J. Clin. Invest. 39:132. 1960
- 

- 64.-IBER, F.L. and CHIPMAN, B.R.  
"Excretion of bilirubin in dogs studied by "stop flow" analysis (abstract)"  
Gastroenterology. 44:479. 1963
- 

- 65.-ISRAELS, L.G.; YAMAMOTO, J.; SKANDERBG, J.; ZIPURSKY, A.  
"Shunt bilirubin: evidence for two components"  
Science. 139:1054. 1963
- 

- 66.-ISRAELS, L.G. and ZIPURSKY, A.  
"Primary shunt hyperbilirubinaemia"  
Nature (London) 193:73. 1962
- 

- 67.-ISSELBACHER, K.J. and MC CARTHY, E.A.  
"Studies on bilirubin sulfate and other nonglucuronide conjugates of bilirubin"  
J. Clin. Invest. 38:645. 1959
- 

- 68.-JOHNSON, L.; SARMIENTO, F.; BLANC, W.A.; DAY, R.  
"Kernicterus in rate with an inherited deficiency of glucuron transferase"  
A.M.A.J. Dis. Child. 97:591. 1959
-

69.-KIYOYASU, N. and KAKISHITA, E.

"Destruction of immature erythrocytes measured by bilirubin excretion"  
Blood. 33:717. May. 1969

---

70.-KLATSKIN, G.; BUNGARDS, L.

"Bilirubin-protein linkages in serum and their relationship to the van den Bergh reaction"  
J. Clin. Invest. 35:537. 1956

---

71.-LAKS, M.M.; PINCUS, I.J. and GOLDBERG, D.

"Renal excretion of bilirubin in the common duct ligated dog"  
Gastroenterology. 44:469. 1963

---

72.-LANDANO, O.M.; IGLESIAS, O.; GOMEZ, E.

"Clearance de bromosulfadeina total, libre y conjugada en el Dubin-Johnson y en el Gilbert"  
Pren. Med. Argent. 54:2072. 1967

---

73.-LEON CASTRO, J.

"Funcion renal en hepatopatias difusas"  
Rev. Clin. Esp. 121:339. May. 1971

---

74.-LESTER, R.; SCHUMER, W.; SCHMID, R.

"Intestinal absorption of bile pigments. IV urobilinogen absorption in man."  
New. Eng. J. Med. 272:939. May. 1965

---

75.-LESTER, R. and SCHMID, R.

"Intestinal absorption of bile pigments. II Bilirubin absorption in Man"  
New England J. Med. 269:178. 1963

---

76.-LESTER, R.; KLEIN, P.D.

"Bile pigment excretion: a comparison of the biliary excretion of bilirubin and bilirubin derivatives"  
J. Clin. Invest. 45:1839. 1966

---

77.-LEVY, M.R.; LESTER, R.; LEVIUSKY, N.G.

"Renal excretion of urobilinogen in the dog"  
J. Clin. Invest. 47:2117. 1968

78.-MALLOY, H.T.; EVELYN, K.A.

"Determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter"

J. Biol. Chem. 119:481. 1937

---

79.-MALVIN, R.L. WILDE, W.S. and SULLIVAN, L.P.

"Localization of mephron transport by flow analysis".

Amer. J. Physiol. 194:135. 1958

---

80.-MARTIN, N.H.

"Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXI: Interactions with bilirubin."

J. Amer. Chem. Soc. 71:1230. 1949

---

81.-MAURER, H.M.; CANL, J.

"Influence of bilirubin on human Platelets."

Pediat. Res. 6:136. 1972

---

82.-NAJJAR, V.A.; CHILDS, B.

"The crystallization and properties of serum bilirubin."

J. Biol. Chem. 204:359. 1953

---

83.-NIZET, E.; BARAC, G.

"Localization intrarenale de la bilirubine chez le chien ictérique."

Compt. Rend. Soc. Biol. 146:1282. 1952

---

83a.-ODELL, G.B.

"The dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications"

J. Pediat. 55:268. 1959

---

84.-OKOLICSANY, L. MAGNENAT, P.; FREI, J.

"Deconjugation of bilirubin glucuronide by the liver."

Lancet. 1:1173. 1968

---

85.-ORELLANA-ALCALDE, J.M.

"Pathogenic classification of jaundice"

Rev. Int. Hepat. 18:75. 1968

---

86.-OSTROW, J.D.; JANDLE, J.H. and SCHMID, R.

"The formation of bilirubin from hemoglobin in vivo."

J. Clin. Invest. 41:1628. 1962

---

87.-OSTROW, J.D.; SCHMID, R.

"The protein-binding of C<sup>14</sup>-Bilirubin in human and murine serum."

J. Clin. Invest. 42:1286. 1963

---

88.-OSTROW, J.D.; SCHMID, R.

"The binding of bilirubin-C<sup>14</sup> to human serum proteins."

Clin. Res. 10:191. 1962

---

89.-PIMSTONE, N.R.

"Renal Degradation of hemoglobin."

Seminars in hematology. 9:31. 1972

---

90.-POLAND, R.L. and ODELL, B.

"Physiologic jaundice: The enterohepatic circulation of bilirubin."

The New Eng. J. Med. 284:1. Jan. 7-1971

---

91.-POPPER, H.; SCHAFFNER, F.

"Progresos en Patologia Hepática. Vol. II."

Edit. Científico-Médica. Año 1967

---

92.-POPPER, H.; SCHAFFNER, F.

"El hígado: su estructura y función. Vol. I

Edit. Noguer. Año 1962

---

93.-POWELL, L.W.; HEMINGWAY, E.; BILLING, B.H.; SHERLOCK, S.

"Idiopathic unconjugated hyperbilirubinemia (Gilbert Syndrome). A study of 42 families."

New. Eng. J. Med. 277:1108. 1967

---

94.-POWELL, L.W.

"Clinical aspects of unconjugated hyperbilirubinemia"

Seminars in Hematology. 9:91. Jan. 1972

---

95.-RABINOWITCH, I.M.

"The renal threshold of Bilirubin"

J. Biol. Chem. 97:163. 1932

---

96.-RAIA, S.

"Histochemical demonstration of conjugated and unconjugated bilirubine"

Nature. 205:304. 1965 (London)

---

97.-RICHARDS, T.G.; TINDALL, V.R. and YOUNG, A.

"A modification of the bromsulphthalein liver function test to predict the dye content of the liver and bile."

Clin. Sci. 18:499. 1959

---

98.-ROBINSON, S.; VAMIER, T.; DESFORGES, J.F. and SCHMID, R.

"Jaundice in Thalassemia Minor: a consequence of ineffective erythropoiesis"

New Engl. Jour. Med. 267:523. 1962

---

99.-ROBINSON, S.H.

"Early labelled bilirubin."

New. Engl. J. Med. 278:565. 1968

---

100.-ROBINSON, S.H.

"Formation of bilirubin from erythroid and nonerythroid sources."

Seminars in Hematology. 9:43. Jan 1972

---

101.-RUGSTAD, H.E.; ROBINSON, S.H.; YANNIONI, C.; TASHJIAN, A.H.

"Transfer of Bilirubin Uridine Diphosphate-Glucuronyltransferase to Enzyme-Deficient Rats."

Jr. N.Y. Acad. Science. 170:553. 1970

---

102.-SCHACHTER, D.

"Stimulation of bilirubin mono- and diglucuronide in the plasma and urine of patients with nonhemolytic jaundice."

J. Lab. and Clin. Med. 53:557. Apr. 1959

---

103.-SCHACHTER, D.

"Nature of the glucuronide in direct-reacting bilirubin."

Science. 126:507. 1957

---

- 104.-SCHMID, R.  
"Direct-reacting bilirubin, bilirubin glucuronide, in serum, bile and urine."  
Science. 124:76. 1956
- 
- 105.-SCHMID, R.  
"The identification of "direct-reacting" bilirubin as bilirubin glucuronide."  
J. Biol. Chem. 229:881. 1957
- 
- 106.-SCHMID, R.  
"Glucuronide formation in patients With constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease)."  
New. Engl. J. Med. 260:1310. 1959
- 
- 107.-SCHMID, R.  
"Congenital defects in bilirubin metabolism."  
J. Clin. Invest. 36:927. 1957
- 
- 108.-SCHMID, R.  
"Metabolism and disposition of C<sup>14</sup> bilirubin in congenital non hemolytic jaundice"  
J. Clin. Invest. 42:1720. 1963
- 
- 109.-SCHMID, R.  
"Bilirubin Metabolism in man."  
New. Eng. J. Med. 287:703 Oct. 1972
- 
- 110.-SCHMID, M.  
"Die <sup>14</sup>C-bilirubin clearance in liver cirrhosis."  
Klin. Wschr. 49:345. 15-III-71
- 
- 111.-SCHOENFIELD, L.J.; BOLLMAN, J.L. and HOFFMAN, H.N.  
"Sulfate and glucuronide conjugates of bilirubin in experimental liver injury."  
J. Clin. Invest. 41:133. 1962
-

- 112.-SCHOENFIELD, L.J.; GRINDLAY, J.H.; FONLK, W.T. and BOLLMAN, J.L.  
"Identification of extrahepatic bilirubin monoglucuronide and its  
conversion to pigment 2 by isolated liver (26362)."  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106:438. 1961
- 
- 113.-SHALM, L.; WEBER, A.P.  
"Jaundice with conjugated bilirubin in hyperhaemolysis"  
Acta. Med. Scand. 176:549. 1964
- 
- 114.-SHANI, M.; GILON, E.; BEN-ERRER, E. and SHEBA, C.  
"Sulfobromophthalein tolerance test in patients with Dubin-Johnson  
Syndrome and their relatives."
- 
- 115.-SNAPPER, I.; BENDIEN, W.M.  
"On the physico-chemical conditions of the bilirubin in the  
blood serum and urine."  
Act. Med. Scand. 98:77. 1938
- 
- 116.-SOLIS HERRUZO, J.A.; PARDO RUEDA, J.  
"Hemodinámica renal en las enfermedades hepáticas"  
Rev. Clin. Esp. 120:299. 28-II-72
- 
- 117.-SOLIS HERRUZO, J.A.  
"Estudio de la función renal en los enfermos cirróticos. I. Diuresis  
y fintración glomerular."  
Rev. Clin. Esp. 121:347. 31-V-71
- 
- 118.-TENHUNEN, R.  
"The enzymatic degradation of Heme."  
Seminars in Hematology. 9:19. Jan 1972
- 
- 119.-THOMPSON, R.P.H.; WILLIAMS, R.  
"Treatment of chronic intrahepatic cholestasis with phenobarbitrone".  
Lancet. ii:646. 1967
-

120.-VAN DER STOK, J.

"The urinary excretion of bilirubin after increased plasmas hemoglobin concentration in dogs."

Experientia. 25:814. 15-VIII-69

---

121.-WALLACE, D.K.; OWEN, E.E.; DURHAM, N.C.

"An evaluation of the mechanism of bilirubin excretion by the human Kidney."

J. Lab. and. Clin Med. 64:741. Nov. 1964

---

122.-WATSON, C.J.

"Recent studies of the urobilin problem."

J. Clin. Path. 16:1. 1963

---

123.-WATSON, D.

"The transport of bile pigments: the binding of sodium bilirubinate to plasma protein."

Clin. Sci. 22:435. 1962

---

124.-WEBER, A.; SCHALM, L.; WITMANS, J.

"Bilirubin monoglucuronide (Pigment I): A complex."

Acta. Med. Scandinav. 173:19. 1963

---

125.-WEINBREN, K.; BILLING, B.H.

"Hepatic clearance of bilirubin as an index cellular function in the regenerating rat liver."

Brit. J. Exp. Path. 37:199. 1956

---

126.-WILLIAMSON, I.; ROBINSON, R.R. and OWEN, E.E.

"Mechanism of bilirubin excretion by the avian Kidney."

Am. J. Physiol. 205:267. 1963

---

127.-WITH, T.K.

"Bilirubin in urine and other secretion apart from the bile and in the cerebrospinal and eye liquors."

Acta. Physiol. Scand. 10:355. 1945

---



128.-WITH, T.K.

"Bilirubin and the renal filter"

New Engl J. Med. 238:415. 1948

---

129.-WITH, T.K.

"The bilirubin excretion test as a functional liver test With remarks on the course of the curve of serum bilirubin"

Acta. Med. Scand. 116:96. 1945

---

130.-WITH, T.K.

"Quantitative studies on the urinary excretion of bilirubin in diseases of the liver and jaundice Without liver lesion"

Act. Med. Scand. 119:214. 1944

---

131.-WOLF, ROBERT.L.; PIZETTE, M.; RICHMAN, A.; DREILING, DAVID A.; JACOBS, W. FERNANDEZ, O. and POPPER, H.

"Chronic idiopathic jaundice. A studies of two afflicted families"

Am. J. Med.:32 Jan 1960

---

132.-YAMAMOTO, T.; SKANDERBERG, J.; ZIPURSKY A.; ISRAELS, L.G.

"Early appering bilirubin: evidence for two components"

J. Clin. Invest. 44:31. 1965

---

133.-SOLIS HERRUZO, J.A.

"Kinética de la B.S.P. en las ictericias disenzimáticas"

Gaceta Médica de Bilbao. 24:283. 1973

---

134.-GILL, Mc., HOFFMAN and BOLLMAN.

"Serum bile pigment fractions during the course of jaundice"

Gastroenterology 43:261. 1962

---

135.-"Tablas científicas Geigy" 6ª Edición

Geigy, S.A. Basilea, Suiza. 1965

---

136.-BANCROFT, H.

"Introducción a la Bioestadística"

Edit. Univ. Buenos Aires. 6ª Edición. 1969